



HAL
open science

Développement de méthodes systémiques pour l'amélioration de la connaissance et du traitement des gliomes

Guillaume Nugue

► **To cite this version:**

Guillaume Nugue. Développement de méthodes systémiques pour l'amélioration de la connaissance et du traitement des gliomes. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENS012 . tel-01283175

HAL Id: tel-01283175

<https://theses.hal.science/tel-01283175>

Submitted on 5 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **BIOTECHNOLOGIE,**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Guillaume NUGUE

Thèse dirigée par **François BERGER**

Codirigée par **Aurélié JUHEM**

Préparée au sein de **Clinatec et Ecrins Therapeutics**

Dans l'École Doctorale **EDISCE**

Développement de méthodes systémiques pour l'amélioration de la connaissance et du traitement des gliomes

Thèse soutenue publiquement le **04 septembre 2014**

Devant le jury composé de :

Professeur François BERGER

Directeur Clinatec, Directeur

Docteur Aurélié JUHEM

Directrice R&D Ecrins Therapeutics SAS, codirectrice

Professeur Jean-Claude DEBOUZY

Professeur du Val-de-Grace, Rapporteur

Docteur David CROUZIER

Chef d'unité, IRBA, Rapporteur



Remerciements

Aux membres du jury :

J'aimerais tout d'abord remercier le Professeur François Berger, directeur de Clinathec, pour m'avoir accueilli au sein de ses laboratoires. Je vous remercie pour ces expériences très enrichissantes auxquelles vous m'avez permis de participer, et d'avoir partagé votre vision de la recherche biomédicale.

Au Docteur Aurélie Juhem, pour son aide précieuse tout au long de cette expérience et sa disponibilité. Merci d'avoir accepté ce travail de co-encadrant, pas toujours évident, toujours agréable de pouvoir échanger avec toi.

A Monsieur le Médecin Général Jean-Claude Debouzy pour vos commentaires lors de l'élaboration de ce manuscrit et les leçons de choses que vous parviendrez à me faire ingérer. C'est un véritable honneur d'avoir eu l'immense privilège de vous rencontrer, d'échanger et de pouvoir évoluer à vos côtés.

Un remerciement particulier pour le Docteur David Crouzier d'avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

A Ecrins Therapeutics :

Un grand merci à Andrei Popov. Merci pour tous tes conseils, et le partage d'idées. Merci pour l'accueil au sein d'Ecrins Therapeutics et d'avoir accepté l'ajout de cette lourdeur administrative.

Merci à toute l'équipe, Aurélie, Delphine et Maroun, pour l'accueil que vous me réservez à chacun de mes passages.

A l'équipe 7 :

Laurent P., merci de m'avoir ouvert les portes de cette équipe, a contre cœur au départ, et de m'avoir gardé avec un peu plus d'enthousiasme. J'aurai une pensée pour toi à chaque changement d'ampoule.

A toi Marie-France d'avoir été aussi présente pour moi, une véritable mère pour nous tous, une chance de t'avoir eu à nos/mes côtés. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta nouvelle vie auprès de Richard (qui lui n'est pas nouveau...).

Didier, la liste est longue et pourrait commencer par PNAS. Merci de m'avoir tenu la porte pendant que je remplissais les cuves d'azotes, pour tes idées quelque peu philosophiques. Il est certain que l'on ne perd pas une fonction, mais on en gagne une différente, en fin de compte tu es optimiste ! Merci pour tes relectures et tes commentaires sur ce travail.

Merci à l'ensemble de l'équipe 7, pour l'accueil que m'avez offert et votre sympathie.

A l'équipe de la direction (elles sont que 2 ;-), pour m'avoir signé mes documents, j'aurai aimé avoir plus de papiers à faire signer.

A l'équipe de Virginie :

Merci Michel pour ton aide précieuse dans l'analyse des différents échantillons, tes remarques pertinentes sur la préservation des échantillons précieux.

Virginie, sans toi ce travail serait bien vide, et surtout bien moins attrayant. Merci pour ta passion, ton enthousiasme et ta rigueur au quotidien. Ça été un immense plaisir de réaliser ce travail à tes côtés.

A ma Famille :

A mes parents, Minique et Martine, de m'avoir fait confiance pendant toutes ces années, et ça a été long ! Merci à vous, père et mère, d'avoir été présent à chaque moment et de continuer à l'être. D'avoir su occuper mes quelques jours de vacances comme depuis toujours. Et tout ça malgré la distance, vous êtes toujours là pour moi, je vous en remercie.

A mon frère Olivier, de m'avoir recueilli à Grenoble, c'est en partie grâce à (ou à cause de) toi que ce manuscrit existe. Merci de m'avoir offert deux nièces, Louanne et Lise, avec un caractère aussi facile que le tiens. Mais on sait bien qu'un travail aussi bien réussi n'est pas que de toi, donc à toi aussi Albane, avec qui tu vis dans le péché. Merci pour tous les pots de pâtés, car on sait bien qui fournit la viande.

A ma quasi-sœur Nathalie, on peut dire que tu m'auras vu grandir ! Pierrot, Polo, Lisa et Zélie, merci à vous tous de m'avoir accueilli et de continuer à le faire.

A mes amis :

Fabien, pour tout ça, et ça ? Non !! Ça oui !!!! De m'avoir suivi pendant ces longues années d'étudiantines, malgré nos parcours bien différents, on a su rester aussi proche et je t'en remercie.

Ju, pour ces échanges toujours aussi extra. On est bien loin du temps de nos révisions, mais quels parcours, et surtout quelles Histoires ! Merci de nous faire découvrir chaque jour de nouveaux jeux, mais perso, les petits Indiens, ça déchire. A nos prochaines Aventures.

Lolo, le neurochirurgien des stars, pour nos 6 mois de conversations avec option replay. Merci de l'accueil que tu m'as fait dans le monde de la recherche. ~~Nos footings~~, nos petits déj devant un beau levé de soleil, le carré de veau sauce aux morilles. Merci de m'avoir permis d'évoluer à tes côtés, de m'avoir fait partager tes valeurs de travail. Mais également de m'avoir accepté au sein de ta famille, ta femme Séverine, tes filles Sarah, Yaelle et Lise et pour les rencontres que tu m'as permis de faire (sauf 1...). A nos collaborations futures.

Isa et ton homme, tes filles Lou et Liz, pour votre amitié si agréable pour moi, et pour tant d'autre chose. Pour ces visites underground, les déguisements dont je ne sais que faire, et surtout « la » rencontre que tu m'as permis de réaliser ? Quoi qu'il en soit tu as su me motiver.

A vous deux Vivien et Cristel, et vos filles Léana et Milane, d'avoir souvent une longueur d'avance sur moi : Quelle brillante idée les fumigènes ! Cris, à quand notre cochon de lait ?

Marie, quelle bavarde ! Merci pour toute l'aide, et il y en a eu pas mal, que tu m'as apportée, qui aurait cru que 4 ans après avoir accompagné le petit stagiaire M1 à son oral, il serait encore là à te saouler ? Au fait, le dosage sur sérum ou plasma ? Merci pour tous ces petits quelque chose que je t'ai demandé et auxquels tu as toujours répondu présente, 5 jours après avoir vu le message sur ton téléphone. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec tes enfants, Charlie, Camille et Antoine et pour tous tes projets.

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	5
Liste des figures	9
Liste des tableaux	11
Abréviations	12
Préface	13
INTRODUCTION	14
1. Les tumeurs cérébrales	19
1.1. Le système nerveux	19
1.2. La barrière hémato-encéphalique	20
1.3. Les gliomes	21
1.3.1. Epidémiologie	21
1.3.2. Classification (OMS 2007).....	23
1.3.3. La classification moléculaire	24
2. La prise en charge thérapeutique	26
2.1. La chirurgie	26
2.2. La radiothérapie	28
2.3. La chimiothérapie	28
2.4. Les thérapies anti-angiogéniques	33
3. La recherche de biomarqueurs par marquage isotopique	37
3.1. Les biomarqueurs	37
3.1.1. La notion de biomarqueurs	37
3.1.2. Généralités	37
3.2. Le marquage isotopique <i>in vivo</i>	38
3.2.1. Les isotopes : définition	39
3.2.2. Le marquage isotopique radioactif	39
3.2.3. Le Carbone 14 : premier radio-traceur « stable ».....	40
3.2.4. Les isotopes stables	40

3.3.	La résonance magnétique nucléaire (RMN)	41
3.4.	La spectrométrie de masse	42
3.4.1.	La SRM (<i>Selected Reaction Monitoring</i>)	43
3.4.2.	Le SILAC	44
3.4.3.	Marquage des protéines <i>in vivo</i>	45
3.5.	Le turnover des protéines	45
PARTIE 1 :		53
Les anticorps monoclonaux thérapeutiques : le bevacizumab		53
1.	Exemple du bevacizumab	55
2.	Article	57
2.1.	Introduction	57
2.2.	Materials and Methods	59
2.2.1.	Patients.....	59
2.2.2.	Treatment and samples	59
2.2.3.	Bead coupling	59
2.2.4.	Bevacizumab Assay Procedure.....	60
2.2.5.	Assay Validation	60
2.2.6.	Statistical analysis	60
2.3.	Results	60
2.3.1.	Developing and validating the bevacizumab assay.....	60
2.3.2.	Variable bevacizumab pharmacokinetics in patients.....	62
2.3.3.	Identifying serum bevacizumab levels as a pharmacodynamic marker	63
2.4.	Discussion	63
3.	Conclusion	68
PARTIE 2 :		70
Délivrance localisée dans le traitement des GBM		70
1.	Matériels et méthode	72
1.1.	Culture cellulaire	72
1.2.	Modèle de xénogreffe murin	72
1.3.	IRM de contrôle	73
1.4.	Traitement	73
1.5.	Dosage de bevacizumab	73

1.6.	Immuno-histofluorescence.....	73
2.	Résultats	74
2.1.	Dosage du bevacizumab.....	74
2.2.	Survie des animaux.....	75
2.3.	Immuno-histofluorescence.....	76
3.	Discussion	78
PARTIE 3 :		80
Le turnover des protéines		80
1.	Matériels et Méthodes	82
1.1.	Etude préclinique	82
1.2.	Préparation des échantillons	84
1.3.	LC-MS/MS et bioinformatique	85
2.	Résultats	85
2.1.	Etude préliminaire	85
2.1.1.	Alimentation	85
2.1.2.	Choix de l'acide aminé	86
2.1.3.	Test de toxicité	88
2.2.	Cinétique d'incorporation.....	88
2.3.	Mesure du <i>turnover</i>	89
3.	Discussion	93
PARTIE 4 :		96
Essai clinique : CARBONOMIC		96
1.	Objectifs de l'étude	98
2.	Balance bénéfique/risque	99
3.	Protocole clinique	101
4.	Dossier pharmaceutique	103
4.1.	Documents techniques	103
4.2.	Qualification de la Valine marquée	103
4.3.	Stabilité de la solution stérile.....	104
CONCLUSION et PERSPECTIVES		106

Bibliographie	110
Annexes	119

Liste des figures

Figure 1 : PET-scan ¹⁸ FDG d'un glioblastome	16
Figure 2 : Schéma du système nerveux chez l'homme.....	19
Figure 3 : Schéma d'un capillaire neuronal.....	21
Figure 4 : Incidence des gliomes en France depuis 1950.....	22
Figure 5 : Nombre de décès des suites d'un glioblastome en France et en 2011	22
Figure 6 : Protocole Stupp pour la prise en charge des glioblastomes chez l'adulte ⁴³	26
Figure 7 : Exérèse chirurgicale d'une tumeur cérébrale assistée par Gliolan® ⁴⁵	27
Figure 8 : Formule du gaz moutarde et d'un moutarde azotée	29
Figure 9 : Structure du Procarbazine, du CCNU et de la Vincristine	30
Figure 10 : Structure du temozolomide	31
Figure 11 : Angiogenèse tumorale	34
Figure 12 : Voie de signalisation induite par le VEGF et VEGFR2 (KEGG)	36
Figure 13 : Composition générale d'un atome	38
Figure 14 : schéma des transformations isobariques	39
Figure 15 : Voie de dégradation de la Valine	42
Figure 16 : Principe générale de la SRM	43
Figure 17 : Schéma représentant le principe du SILAC.....	44
Figure 18 : Modèle à 3 compartiments simplifié dans le turnover de protéines.....	46
Figure 19 : Variation de l'abondance isotopique relative	50
Figure 20 : Position de marquage possible sur un peptide.	51
Figure 21 : Mode d'action du bevacizumab sur l'angiogenèse.	55
Figure 22 : Bevacizumab assay calibration.....	61
Figure 23 : Evolution of blood bevacizumab concentrations.....	65
Figure 24 : Serum bevacizumab levels as a function of treatment efficacy.	67
Figure 25 : Injection intratumorale de drogue sur le principe de la CED.....	72
Figure 26 : Concentration locale de bevacizumab	75
Figure 27 : Courbe de Kaplan-Meier de la survie de souris.....	76
Figure 28 : Immunohistochime de coupe cerveau de souris.....	77
Figure 29 : Composition de l'alimentation sans valine des souris.....	83
Figure 30 : Protocole expérimental	84
Figure 31 : Comparaison du taux de peptides trypsique marqués et non marqués.....	86

Figure 32 : Suivi d'incorporation du marquage à la $^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ -Valine.....	89
Figure 33 : Suivi du marquage isotopique in vivo sur des peptides di-valines.....	91
Figure 34 : Turnover de protéines cérébrale chez la souris.....	92
Figure 35 : Profil de la variation du RIA au court du temps pendant et après un marquage .	93
Figure 36 : Première étape de la dégradation de la valine chez l'homme	94
Figure 37 : Imagerie nucléaire d'un glioblastome	98
Figure 38 : schéma du protocole clinique	102

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification selon l'OMS des principaux types de gliomes selon le grade.....	24
Tableau 2 : Marqueurs moléculaires dans les gliomes.....	25
Tableau 3 : Effet de la radiothérapie sur la survie dans les gliomes de haut grade.....	28
Tableau 4 : Molécules cytotoxiques utilisées en oncologie.....	32
Tableau 5 : Principales molécules anti-angiogéniques approuvées par la FDA.....	35
Tableau 6 : Radio-isotopes utilisés en imagerie nucléaire médicale.....	40
Tableau 7 : Exemple d'isotopes stables.....	41
Tableau 8 : Rapport gyromagnétique.....	41
Tableau 9 : Acides aminés essentiels pour l'homme.....	49
Tableau 10 : Anticorps monoclonaux en cancérologie.....	55
Tableau 11 : Validation of bevacizumab assay.....	62
Tableau 12 : Patient characteristics.....	64
Tableau 13 : Etudes réalisées avec un marquage isotopique à la leucine.....	87
Tableau 14 : Caractéristiques d'acides aminés essentiels.....	88
Tableau 15 : Etudes décrivant un essai clinique avec un marquage isotopique stable.....	98
Tableau 16 : Essais cliniques réalisés avec des molécules avec marquage isotopique.....	100
Tableau 17 : Schéma des doses injectées en fonction du poids des patients.....	102
Tableau 18 : Synthèse de la qualification de la valine marquée.....	104

Abréviations

ADN	Acide desoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BHE	barrière hémato-encéphalique
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CED	<i>Convection enhanced-delivry</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EGFR	Epidermal growth factor
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
FDG	Fluoro-désoxyglucose
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GBM	Glioblastome multiforme
HR-MAS	<i>High resonance magic angle spinning</i>
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
IRM	Imagerie à résonance magnétique
IP	Intrapéritonéal
IDH	Isocitrate dehydrogenase
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
LC-SRM	<i>Liquid chromatography coupled to selected reaction monitoring</i>
MGMT	O ⁶ -methylguanine methyltransferase
OMS	Organisation mondiale de la santé
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
RIA	<i>relative isotope abundance</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
SVF	Sérum de veau foetal
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture</i>
SN	Système nerveux
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TMZ	temozolomide
TOF	Temps de vol (Time Of Fly)
PET	Tomographie par Émission de Positrons
VEGF	<i>Vascular endothelium growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelium growth factor receptor</i>

LETTER

Angiogenesis and the tumor space–time continuum

Tumors invade space through cancer cell proliferation and tumor mass expansion. Tumor growth is maintained over time using the cancer stem cell pool, which is the cell population with self-renewal potential. The work by Conley et al. (1) provided evidence that antiangiogenic agents increase cancer stem cells through the generation of tumor hypoxia. These findings are in accordance with the findings showing that hypoxia induces stem cell markers expression in cancer cells (2, 3) and that anti-angiogenic therapy elicits malignant progression of tumors (4). Thus, there is now sufficient evidence to reconsider the role of tumor angiogenesis in cancer progression. Tissues need nutrients and oxygen for growth, and tumors behave as other tissues. This view is the classical view, in which, according to the work by Folkman (5), the role of tumor angiogenesis fulfills the function of normal vessels that is to deliver oxygen and metabolites and remove waste products. However, tumor vessels are abnormal and fail to fulfill these functions. Therefore, tumors have naturally chronic and cyclic hypoxic regions. This paradoxical consequence of tumor angiogenesis is that, because of its deficiencies, it also generates hypoxia. In pathology such as cancer, a defect in a physiological process does not necessarily suppress the function of the process but can generate a novel function

required for disease development. Here, the other function of tumor angiogenesis is to maintain tumor growth over time through cancer stem cell increase. This dual nature of tumor angiogenesis ensures a balance between growth over space (by providing oxygen and nutrients; i.e., physiological function) and growth over time (by generating hypoxic regions that increase the cancer stem cell pool; i.e., pathophysiological function). Hence, tumors require both the physiological and pathophysiological functions of tumor angiogenesis. Therefore, the significance of tumor angiogenesis is the generation of a tumor space–time continuum.

Guillaume Nugue and Didier Wion¹

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Université Joseph Fourier, 38043 Grenoble Cedex, France

1. Conley SJ, et al. (2012) Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:2784–2789.
2. Mathieu J, et al. (2011) HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res* 71:4640–4652.
3. Qiang L, et al. (2012) HIF-1 α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. *Cell Death Differ* 19: 284–294.
4. Páez-Ribes M, et al. (2009) Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15: 220–231.
5. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182–1186.

Author contributions: G.N. and D.W. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: didier.wion@ujf-grenoble.fr.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Chaque année, 14 millions de nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués dans le monde. En 2012, on estimait à 8,2 millions le nombre de décès des suites d'un cancer, ce qui en fait la première cause de mortalité au monde ¹. En France, pas moins de 150 000 décès par an, soit 30%, sont liés au cancer tout type confondu ². Le cancer est donc un enjeu de santé public. Dans un contexte plus particulier, les tumeurs du système nerveux (SN) représentent 3% des cas de cancers, dont 70% sont des gliomes ³. En France, l'incidence des gliomes est de 5,1/100 000 habitants et par an et une mortalité de 3,2/100 000 habitants chaque année, ce qui associe à cette pathologie relativement rare une mortalité importante ⁴.

Du fait de leur localisation intracérébrale, les gliomes sont des tumeurs particulières et difficilement accessibles. En effet, le cerveau, protégé par la boîte crânienne, est le principal organe du SN. L'homéostasie cérébrale doit être régulée finement du fait de la grande spécificité d'organisation des réseaux neuronaux, associée à la capacité de division limitée des neurones. C'est pourquoi le microenvironnement cérébral est protégé par la barrière hémato-encéphalique (BHE), véritable filtre permettant un apport suffisant en nutriments, l'évacuation des déchets et le protégeant des substances neurotoxiques circulantes. Le rôle de la BHE dans la bio-distribution des médicaments au niveau du parenchyme cérébral et tumoral est bien connu. La BHE est en partie responsable de la faible distribution tumorale des molécules anticancéreuses dans le traitement des gliomes. Cette structure représente un défi majeur dans le traitement des tumeurs cérébrales en limitant la diffusion de molécules thérapeutiques jusqu'aux cellules tumorales.

Le glioblastome multiforme (GBM) est la forme la plus fréquente des tumeurs primaires du SN. Malgré une prise en charge thérapeutique optimale, en l'état de nos connaissances la médiane de survie est de 15 mois ⁵. La prise en charge thérapeutique classique des gliomes est composée d'une chirurgie, suivie d'une radiochimiothérapie concomitante et d'une chimiothérapie adjuvante ⁶. Malheureusement, une des caractéristiques de ces tumeurs est leur potentiel infiltratif qui se traduit par l'impossibilité de réaliser une exérèse chirurgicale totale et qui, associé à une hétérogénéité tumorale, ⁷ conduit à une récurrence quasi-systématique après la chirurgie. Cette récurrence est souvent accompagnée d'une chimiorésistance.

Ces phénomènes de résistance et de forte toxicité des chimiothérapies stimulent la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques. De nombreuses études génomiques et

INTRODUCTION

transcriptomiques ont permis de mettre en avant des mutations clés dans les phénomènes tumoraux, permettant également d'asseoir un diagnostic ⁸⁻¹⁰. Ainsi, La méthylation du promoteur O⁶-methylguanine méthyltransferase (MGMT) est un facteur prédictif de la chimio-sensibilité des gliomes ¹¹.

La recherche de biomarqueurs permettant une amélioration de la prise en charge diagnostique mais aussi pronostique est un enjeu majeur en cancérologie. A ce jour les différentes approches utilisées se sont révélées insatisfaisantes ^{12,13} ; cette situation pourrait changer avec l'utilisation de nouveaux outils de hautes performances développés, notamment en protéomique ¹⁴.

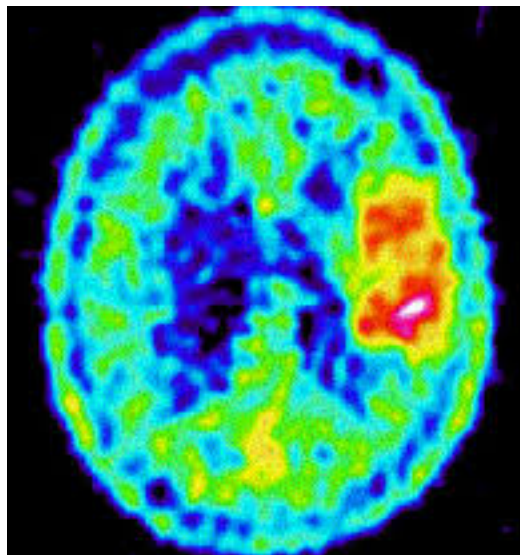


Figure 1 : PET-scan ¹⁸FDG d'un glioblastome

Il est admis que les taux de transcrits et de protéines ne sont pas corrélés ¹⁵, alors que le métabolisme tumoral n'a été que très peu étudié. L'analyse de la dynamique du métabolisme semble essentielle. Des techniques d'imageries permettent aujourd'hui de mettre en évidence une cinétique rapide dans les tumeurs cérébrales. L'incorporation de molécules radioactives (¹⁸FDG-glucose) qui permettent, par PET-scan (*Positron Electron Tomography Scanner*), de mettre en évidence les zones tumorales par l'accumulation du traceur radioactif. Cette technique qui repose sur une administration intraveineuse de marqueur radioactif permet donc de suivre l'évolution de la pathologie mais reste une unique analyse d'imagerie médicale. On pourrait imaginer combiner le marquage *via* un acide aminé marqué

INTRODUCTION

à une étude protéomique associée, comme par exemple l'identification de protéines à dynamique rapide dans la pathologie. Le SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*) est une technique innovante de marquage isotopique *in vitro* des protéines de la cellule permettant une analyse comparative du protéome cellulaire ¹⁶. Le transfert de cette technique vers une utilisation *in vivo* nous offre la possibilité d'étudier le *turnover* de protéines.

La connaissance du *turnover* protéique permettrait de mettre en évidence des modifications de celui-ci associées à la pathologie ou à la réponse au traitement venant compléter les modifications post traductionnelles impliquées dans les phénomènes d'activation/inactivation des protéines. Cette technique a été validée dans plusieurs études *in vivo*. L'équipe de Matthias Mann produit des souris dites SILAC, où l'ensemble du protéome est marqué à 100% avec l'acide aminé marqué dans le but de faire des échantillons contrôles. Les souris sont alimentées pendant plusieurs jours et sur plusieurs générations avec des aliments présentant un acide aminé enrichi en carbone 13, azote 15 ou encore deutérium ¹⁷. Traditionnellement, le SILAC utilise la lysine et/ou l'arginine pour les marquages isotopique ¹⁶. Une approche différente entreprise par l'équipe de Robert Beynon étudie le *turnover* protéique chez le poulet. Une alimentation contenant de la valine deutérée est utilisée dans cette étude. Les analyses sont réalisées par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF ¹⁸. Cette approche a également été utilisée chez l'homme par l'équipe de Holtzman aux USA dans le contexte pathologique de la maladie d'Alzheimer. Utilisant un marquage isotopique au carbone 13 d'un acide aminé essentiel, la leucine (¹³C₆-Leucine), ils ont mesuré la dynamique de la protéine β-Amyloïde par spectrométrie de masse, dont l'agrégation dans les plaques amyloïdes constitue un événement important de la physiopathologie ¹⁹. L'ensemble de ces travaux démontre la faisabilité de l'utilisation d'un acide aminé enrichi au carbone 13 pour suivre le *turnover* d'une protéine chez l'homme.

La recherche de biomarqueurs est une étape importante dans l'amélioration et la personnalisation de la prise en charge thérapeutiques des cancers. La mise en place de biomarqueurs compagnons dans le suivi des biothérapies permettrait un *monitoring* en temps réel de l'effet du traitement et ouvrirait la voie à la thérapie personnalisée ²⁰. Le récepteur des œstrogènes en est un bon exemple et a été l'un des premiers biomarqueur compagnon en oncologie. Les études menées dans les années 1970 ont montré que l'ablation chirurgicale des ovaires et/ou des glandes surrénales induisaient une réponse thérapeutique favorable chez les patientes atteintes d'un cancer du sein avancé à récepteur

INTRODUCTION

des œstrogènes positifs^{21,22}. En revanche, la régression de la tumeur suivant ces ablations chirurgicales se produit rarement chez les femmes atteintes d'un cancer à récepteur des œstrogènes négatif. Par la suite, l'ablation du système endocrinien a été remplacée par un traitement adjuvant au tamoxifène qui a permis une diminution de près de 50% du taux de récurrence pour les patientes avec une tumeur à récepteur des œstrogènes positifs^{23,24}.

Dans un autre contexte pathologique, les études menées sur le bevacizumab montrent une grande hétérogénéité aussi bien de la pharmacocinétique que de l'efficacité clinique avec l'apparition d'effets secondaires entre les patients²⁵. La difficulté actuelle est de maîtriser l'ensemble des mécanismes de réponse de ces nouveaux traitements afin d'en extraire les meilleurs candidats biomarqueurs. Pour cela, nous avons développé une technique de marquage isotopique *in vivo* avec un acide aminé marqué, dans le but d'étudier la dynamique du protéome tumoral. Cette stratégie, jamais appliquée à la cancérologie, permettrait de mieux comprendre les mécanismes fonctionnels de cancérisations mais également de réponses thérapeutiques. Les premiers résultats concluants nous ont incités à transférer la technique chez l'homme, dans les glioblastomes, au travers un essai clinique.

Au travers cette étude, nous avons dans un premier temps montré l'intérêt de mettre en place un *monitoring* au travers d'un biomarqueur compagnon dans le traitement anti-angiogénique par le bevacizumab dans les glioblastomes. Ce biomarqueur permettrait de suivre l'efficacité du traitement, de sélectionner les patients pour lesquels la thérapie serait la plus adaptée et d'anticiper les effets du traitement^{20,26}. En dépit d'une efficacité réelle, de nombreuses études montrent un risque important dans l'utilisation du bevacizumab²⁷. Or, la pharmacocinétique de l'anticorps pourrait jouer un rôle majeur dans l'apparition d'effets secondaires mais également dans le manque d'efficacité chez certains patients. Afin d'améliorer l'efficacité du bevacizumab dans le traitement des glioblastomes, nous avons testé une administration par *convection enhanced delivery* (CED)^{28,29}. Alors que les doses injectées étaient 3 fois inférieures, l'administration intra-tumorale par CED du bevacizumab améliorait significativement l'effet du traitement. Pour répondre au manque de biomarqueurs compagnons, une stratégie de marquage isotopique pour la recherche de candidats biomarqueurs est mise en place. Cette stratégie s'appuie sur l'étude du *turnover* protéique qui pourrait être modifié dans la pathologie et dans la réponse au traitement. Cette stratégie nous donnerait la possibilité d'étudier la biologie fonctionnelle de la pathologie et de son adaptation aux molécules thérapeutiques.

1. Les tumeurs cérébrales

1.1. Le système nerveux

Le système nerveux est un organe essentiel dans le monde animal. Il est spécialisé dans la transmission, l'analyse et l'interprétation des informations. Chez l'homme, il est constitué par le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP).

Système Nerveux Périphérique

Système Nerveux Central

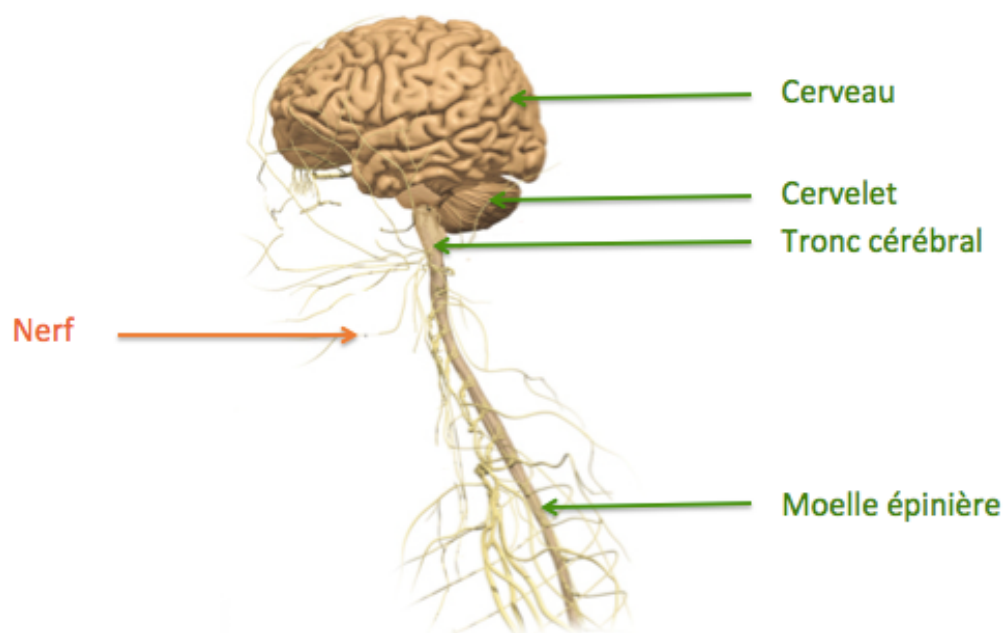


Figure 2 : Schéma du système nerveux chez l'homme

Le SNC est composé par l'encéphale et la moelle épinière. Son rôle est de recevoir, enregistrer, interpréter les informations provenant du SNP. L'encéphale est intégré dans la boîte crânienne et comprend le cerveau, le tronc cérébral et le cervelet. La moelle épinière prolonge le tronc cérébral et prend place au niveau du rachis pour se terminer au niveau de la première vertèbre lombaire (L1).

INTRODUCTION

Les cellules gliales assurent le soutien du SNC. On retrouve quatre principaux types cellulaires :

- Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes de l'encéphale. Elles ont un véritable rôle de soutien.
- Les oligodendrocytes synthétisent la myéline qui entoure les axones dans le SN.
- Les cellules épendymaires, localisées sur les parois des cavités ventriculaires et de la moelle épinière, permettent les échanges entre le liquide cérébro-spinal et le parenchyme cérébral.
- La microglie a des propriétés de phagocytose.

Le SNP a un rôle de messenger de l'information de la périphérie vers le SNC et du SNC vers les organes effecteurs. Il est formé de ganglions et de nerfs.

1.2. La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière physiologique qui sépare le SNC de la circulation sanguine. La BHE joue un rôle de filtre par sa perméabilité aux nutriments essentiels à la fonction cérébrale, en régulant le passage des ions, et par son imperméabilité aux substances neurotoxiques présentes dans le sang représentant un risque pour l'intégrité du parenchyme cérébral. La BHE tapisse les parois vasculaires. Elle est constituée de cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées.

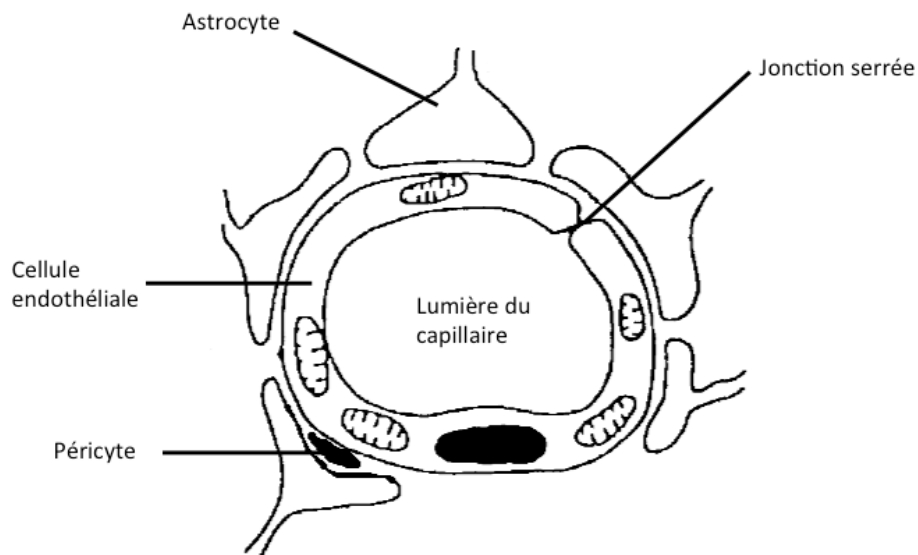


Figure 3 : Schéma d'un capillaire neuronal ³⁰.

1.3. Les gliomes

Les gliomes constituent un ensemble hétérogène de tumeurs primitives du SNC. Cette grande hétérogénéité des gliomes, aussi bien au niveau clinique, pathologique, que pronostic, en fait un véritable challenge pour la recherche biomédicale.

1.3.1. Épidémiologie

Les gliomes représentent 70 à 80 % des tumeurs primitives du SNC ³. Ce sont les tumeurs primitives du SNC les plus fréquentes. Le taux d'incidence des gliomes varie significativement par type histologique, l'âge du diagnostic, le genre et également le pays ³¹. Il est difficile de faire une étude rétrospective des différentes sous classes de gliomes sur les 50 dernières années. En effet les classifications ont extrêmement évoluées et ne permettent pas une comparaison stricte.

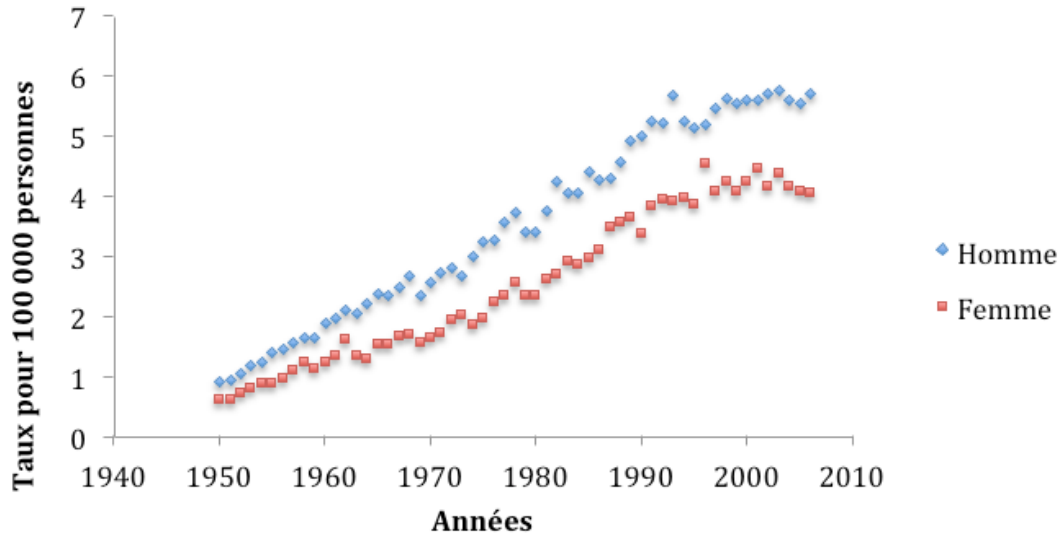


Figure 4 : Incidence des gliomes en France depuis 1950 ⁴.

Cependant, l'évolution des cas de gliomes (tous types confondus) sur les 60 dernières années est effrayante, puisque l'incidence en France était de 0,5 cas pour 100.000 habitants en 1950 et de 5,1 cas pour 100.000 habitants d'aujourd'hui (Figure 4) ⁴. Cette forte augmentation s'explique par un vieillissement de la population, puisque l'on observe un pic de l'incidence entre 55 et 64 ans (Figure 5) mais également par une amélioration des techniques de diagnostic (Scanner, IRM). L'issue est systématiquement fatale à moyen terme, mais le pronostic dépend principalement du type histologique et du grade.

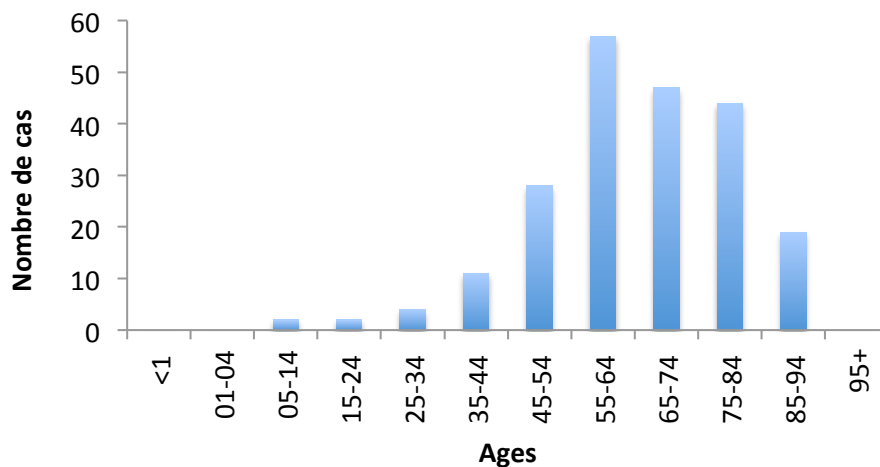


Figure 5 : Nombre de décès des suites d'un glioblastome en France et en 2011 ².

1.3.2. Classification (OMS 2007)

Afin d'obtenir une cohérence mondiale dans la prise en charge des tumeurs cérébrales, il a été nécessaire de les classer de façon homogène et stricte. C'est pourquoi l'OMS a mis en place une classification internationale des tumeurs cérébrales dès 1979³². La première version de la classification de l'OMS met en commun les travaux de Bailey et Cushing en 1926 et de Kernohan en 1949^{33,34}. La seconde édition introduit les techniques d'immunohistochimie dans le diagnostic de la pathologie³⁵. La troisième édition incorpore les modifications génomiques qui permettent un meilleur diagnostic, et donne une classification plus complète en prenant en compte les signes cliniques, l'imagerie, les modifications moléculaires, avec un diagnostic et un pronostic associé³⁶.

Le standard actuel de la classification de l'OMS date de 2007³⁷ et distingue plusieurs catégories de gliomes :

Astrocytomes

Les astrocytomes sont des tumeurs infiltrantes qui touchent les cellules astrocytaires. Ils représentent près de 75% des gliomes. L'astrocytome correspond à des grades histologiques différents (grade I à grade IV) et le pronostic est très variable (tableau 1).

- Les astrocytomes pilocytiques (pronostic à 10 ans)
- Les astrocytomes diffus (pronostic à 8 ans)
- Les astrocytomes anaplasiques (pronostic à 2,5 ans)
- Les glioblastomes (pronostic à 15 mois).

Oligodendrogliomes

Les oligodendrogliomes sont des tumeurs qui touchent les cellules oligodendrocytaires. Ils représentent moins de 15 % des gliomes. Leur dysfonctionnement impacte directement l'intégrité physique des neurones. On distingue deux types :

- Les oligodendrogliomes (pronostic à 8 ans)
- Les oligodendrogliomes anaplasiques (pronostic à 2,5 ans)

Ependymomes

Les épendymomes sont des tumeurs qui affectent les épendymocytes. Ils représentent 10 % des gliomes. On distingue 3 grades histologiques différents associés à pronostic variable :

- Les subependymomes (pronostic à 10 ans)
- Les épendymomes (pronostic à 8 ans)
- Les épendymomes anaplasique (pronostic à 2,5 ans)

Le grade défini en fonction des paramètres de densité cellulaire, atypies nucléaires, mitoses, prolifération micro-vasculaire et nécrose, vient compléter la classification en apportant une information pronostic :

- grade I : tumeurs bénignes à croissance lente et généralement bien circonscrites.
- grade II : tumeurs pré-malignes, à croissance lente mais limites imprécises.
- grade III : tumeurs malignes à croissance modérée.
- grade IV : tumeurs hautement malignes à croissance rapide et limite tumorale mal définie.

Tableau 1 : Classification selon l'OMS des principaux types de gliomes selon le grade ³⁷.

Grade	Tumeurs Astrocytaires	Tumeurs oligodendrogiales	Tumeurs Ependymaires	Médiane de survie
I	Astrocytome Pilocytique	-	Subependymome	10 ans
II	Astrocytome Diffus	Oligodendrogliome	Ependymome	8 ans
III	Astrocytome Anaplasique	Oligodendrogliome Anaplasique	Ependymome Anaplasique	2,5 ans
IV	Glioblastome	-	-	15 mois

1.3.3. La classification moléculaire

Des profils de modifications moléculaires ont été identifiés et ont pu être corrélés avec la classification histologique et le pronostic des gliomes. Les tumeurs astrocytaires peuvent ainsi emprunter des voies de progression tumorale alternatives passant respectivement par

INTRODUCTION

une inactivation de TP53 et une amplification de EGFR associées aux glioblastomes ³⁸. Les tumeurs oligodendrocytaires sont, elles, associées à une codélétion des chromosomes 1p et 19q ⁹. Les mutations IDH1, IDH2, la codélétion 1p et 19q ainsi que la méthylation du promoteur O⁶-methylguanine methyltransferase (MGMT) sont des marqueurs moléculaires utilisés en routine car ils ont des valeurs diagnostique, pronostic et prédictive ^{39,40}

Les nitroso-urées sont des agents alkylants, employés dans le traitement des gliomes de haut grade, qui entraînent la mort des cellules tumorales par liaison à l'ADN. La MGMT confère aux cellules qui l'expriment une résistance aux nitroso-urées ⁴¹. La méthylation du promoteur MGMT est un facteur prédictif de la chimiosensibilité des gliomes associé à une meilleure survie globale. Pour un traitement standard de radiothérapie combinée au temozolomide (TMZ), la survie moyenne est de 21,7 mois pour les patients ayant une méthylation de MGMT contre 12,7 pour les patient sans méthylation de MGMT ¹¹.

Tableau 2 : Marqueurs moléculaires dans les gliomes ⁴⁰.

	IDH1/2	1p/19q	MGMT	EGFRvIII	BRAF
Astrocytome pilocytique	-	-	<10%	-	50%
Astrocytome diffus	75%	15%	45%	-	rare
Oligoastrocytome / Oligodendrogliome	75%	45%	70%	-	rare
Astrocytome Anaplasique	60%	15%	50%	-	rare
Oligoastrocytome / Oligodendrogliome Anaplasique	70%	70%	70%	-	rare
Glioblastome	10%	<5%	35%	30%	<5%

2. La prise en charge thérapeutique

D'importantes avancées ont été faites dans la compréhension et la prise en charge des gliomes ⁴². La difficulté majeure dans le traitement des tumeurs cérébrales est l'accessibilité du tissu pathologique, puisqu'il est protégé physiquement par la boîte crânienne et physiologiquement par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette dernière joue un véritable rôle de filtre protégeant ainsi le tissu cérébral et limitent le passage des drogues habituellement utilisées en oncologie.

La prise en charge thérapeutique des gliomes est multidisciplinaire. Le protocole Stupp est la référence actuelle dans la prise en charge des gliomes. Il comprend une exérèse chirurgicale la plus totale possible, suivie d'une radio-chimiothérapie concomitante suivie d'une chimiothérapie adjuvante ⁶.

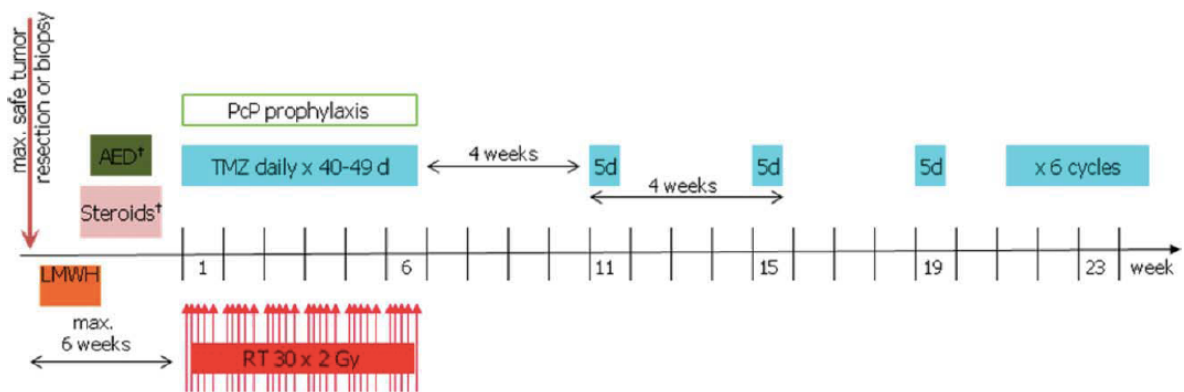


Figure 6 : Protocole Stupp pour la prise en charge des glioblastomes chez l'adulte <70 ans ⁴³.

2.1. La chirurgie

La chirurgie est le traitement de première intention des gliomes. La localisation intracérébrale de la tumeur peut rendre la résection tumorale délicate sur la balance bénéfique/risque, dans ce cas une simple biopsie stéréostatique sera réalisée.

La chirurgie consiste en une résection tumorale la plus complète possible. Les gliomes de haut grade sont des tumeurs très infiltrantes qui ne permettent pas d'avoir une délimitation stricte entre le tissu sain et le tissu tumoral, ce qui limite à une exérèse macroscopique. Les

INTRODUCTION

bords des tumeurs cérébrales étant mal délimités, il est difficile de faire une exérèse complète mais une étude montre que l'exérèse tumorale la plus complète possible favorise le pronostic ⁴⁴.

Cette chirurgie a une double fonction : de limiter les contraintes liées à la masse tumorale sur le cerveau et d'obtenir une information anatomopathologique indispensable pour une mise en place thérapeutique adjuvante adaptée.

L'importance de la qualité de l'exérèse a conduit à développer de nouvelles techniques permettant d'accompagner le chirurgien dans une exérèse complète comme le Gliolan® qui marque par fluorescence le tissu tumoral et apporte un confort au chirurgien ⁴⁵. Le principe repose le marquage des cellules tumoral par un apport massif d'acide 5 amino-lévilinique (5-ALA). Ce dernier sera transformé par une réaction enzymatique en protoporphyrine IX (PPIX). Après excitation en lumière bleue correspondant au spectre d'absorption de la PPIX (≈ 410 nm), celle-ci va émettre une lumière rouge (≈ 635 nm) en revenant à son niveau d'énergie initiale.



Figure 7 : Exérèse chirurgicale d'une tumeur cérébrale assistée par Gliolan® ⁴⁵

2.2. La radiothérapie

La radiothérapie est réalisée à la suite de la chirurgie, pour compléter ou « remplacer » cette dernière qui se limite en une exérèse macroscopique. La radiothérapie permet un ciblage précis des berges de la tumeur et limite ainsi la prolifération du tissu tumoral infiltrant.

La radiothérapie des tumeurs cérébrales est pratiquée depuis les années 70 et montre un effet significatif sur la survie des patients irradiés. L'étude de Sheline (tableau 2) met en évidence une survie à 1 an de 8% dans le groupe ayant eu chirurgie seule contre 24% dans le groupe ayant eu une radiothérapie associée à la chirurgie ⁴⁶.

L'effet dose a été mis en évidence dans les travaux de Walker et al., la médiane de survie est proportionnelle à la dose d'irradiation de 45 à 60 Gy, respectivement 13,5 et 42 semaines ⁴⁷. Le schéma classique de radiothérapie consiste en une irradiation de 60Gy en 30 fractions de 2Gy ^{6,46,47}.

Tableau 3 : Effet de la radiothérapie sur la survie dans les gliomes de haut grade ⁴⁶.

Gliome Grade	Thérapie	% de survie moyenne			
		1 an	2 ans	3 ans	5 ans
III	Chirurgie seule	12	6	7	3
III	Chirurgie + Radiothérapie	40	31	27	16
IV	Chirurgie seule	8	3	0	0
IV	Chirurgie + Radiothérapie	24	9	6	0

2.3. La chimiothérapie

L'effet anti-cancéreux de molécules cytotoxiques a été découvert dans les années 40 par l'effet du gaz moutarde, un puissant gaz de combat de la Première Guerre Mondiale. En 1963, Mahaley et al. montrent un effet sur des tumeurs cérébrales chez l'homme du chlorhydrate mechlorethamine, un dérivé du gaz moutarde. L'analyse histologique de tissus montre une réponse au traitement ⁴⁸.

Les moutardes azotées sont des agents alkylants qui dérivent du gaz moutarde avec le remplacement du soufre par un groupement azoté (figure 7).

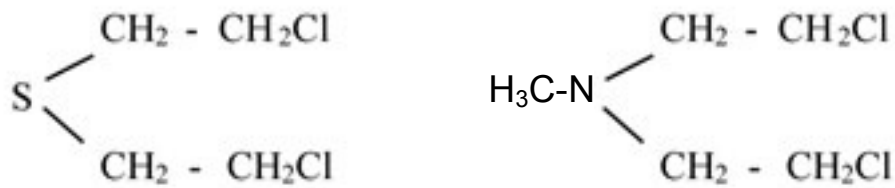


Figure 8 : Formule du gaz moutarde et d'un moutarde azotée

Les cellules cancéreuses sont des cellules à cinétique rapide dans un environnement neuronal. La chimiothérapie utilise cette spécificité, en ayant une action courte mais focalisée sur les cellules en division. Un grand nombre de chimiothérapies sont actuellement utilisées en clinique ayant des modes d'actions complémentaires mais centrée sur leur pouvoir cytotoxiques. C'est pourquoi les chimiothérapies sont administrées par cycle afin de limiter l'atteinte des cellules saines.

Les **agents alkylants** constituent une première classe de chimiothérapie. Ils interagissent avec l'ADN. L'ajout d'un groupement alkyle sur la guanine inhibe la réplication de l'ADN. Parmi les agents alkylant, on retrouve :

- les moutardes azotées (ex : la chloréthine¹),
- les nitroso-urées (la carmustine, la lomustine).

Les molécules nitroso-urées, par leur propriété liposoluble, passent extrêmement bien la BHE. Elles sont donc adaptées au traitement des gliomes.

- les sels de platine (ex : le cisplatine),
- les triazènes (ex : le témozolomide),
- les hydrazines (ex : la procarbazine).

Les **antimétabolites** ont un effet toxique sur les cellules en bloquant la division ou la croissance cellulaire. Ils réalisent une compétition avec un métabolite fonctionnel essentiel à la vie de la cellule. Parmi les antimétabolites on retrouve :

- Les pyrimidiques (ex : 5-fluorouracile)
- Les purines

¹ Première molécule cytotoxique utilisée chez l'homme dès 1949. Le rapport bénéfice/risque a conduit à l'arrêt de son utilisation clinique.

INTRODUCTION

- Les folates (ex : méthotrexate)

Les **inhibiteurs de topoisomérases** agissent sur la conformation spatiale de l'ADN, on en distingue deux types :

- la topoisomérase I (ex : irinotecan)

Elle coupe et ressoude un seul brin de l'ADN.

- la topoisomérase II (ex : etoposide)

Elle coupe les deux brins de l'ADN et les ressoude dans une conformation différente après modification de sa torsion.

Les **poisons du fuseau** sont des molécules antimitotiques qui bloquent le fuseau achromatique indispensable à la migration des chromosomes lors de la mitose. On retrouve :

- Les vinca-alcaloïdes (ex : la vincristine)
- Les taxanes (ex : Paclitaxel)

Les **inhibiteurs de tyrosine-kinase** (ex : Imatinib).

Actuellement, deux protocoles de chimiothérapies sont utilisés dans le traitement des gliomes :

- Le protocole **Procarbazine**, Lomustine (ou **CCNU**), **Vincristine** (PCV)

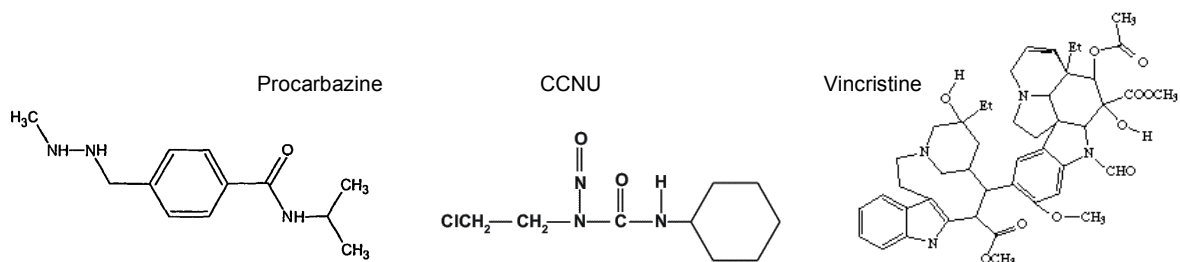


Figure 9 : Structure du Procarbazine, du CCNU et de la Vincristine

Le PCV est utilisé depuis 1976 dans le traitement des gliomes ⁴⁹. Cette chimiothérapie présente de bons résultats dans le traitement des oligodrogliomes. On constate une

INTRODUCTION

amélioration significative de la survie sans progression chez les patients traité par radiothérapie + PCV que radiothérapie seule, respectivement 42,3 mois contre 30,6 mois ⁵⁰. Il s'agit d'une chimiothérapie combinatoire associant la procarbazine, la lomustine et la vincristine. La lomustine (CCNU) fait partie des nitrosourées. Elle est hydrolysée dans le foie et pénètre bien la BHE. La vincristine est un alcaloïde qui bloque la polymérisation de la tubuline. La procarbazine, dérivée de la méthylhydrazine, est un agent alkylant et inhibe les synthèses de l'ADN, de l'ARN et des protéines ⁵¹.

- Le temozolomide

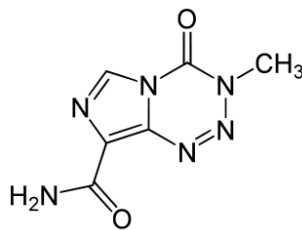


Figure 10 : Structure du temozolomide

Le temozolomide est utilisé depuis 1999 dans le traitement des gliomes. Administré par voie orale, il permet un bon confort de vie du patient. Le temozolomide est hydrolysé à pH physiologique en 3-méthyl-(triazén-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC). Le MTIC est un agent alkylant de l'ADN. Il présente de bons résultats dans le traitement des glioblastomes et passe très bien la BHE grâce à sa propriété lyophile ⁵².

Tableau 4 : Molécules cytotoxiques utilisées en oncologie.

Catégorie	Classe	molécule	médicament
Agent Alkylant	Les moutardes azotées	Cyclophosphamide	Endexan®, Ethyol®
		Ifosfamide	Holoxan®
		Melphalan	Alkéran®
		Chlorambucil	Chloraminophène®
		chloréthine	Caryolysine®
	Les nitroso-urées	Carmustine	Gliadel®, Bicnu®
		Lomustine ou CCNU	Bélustine®
		Fotémustine	Muphoran®
		Streptozocine	Zanosar®
	Les sels de platine	Cisplatine	
		Carboplatine	
		Oxaliplatine	Eloxatine®
	Les triazène	Temozolomide	Temodal®
Les hydrazine	Procarbazine	Natulan®	
Anti-métabolites	anti pyrimidique	5-fluorouracile	UFT®, Xéloda®
		Cytarabine	Aracytine®, Cytarbel®
		Gemcitabine	Gemzar®
	Antipurine	Mercaptopurine	Purinéthol®
		Tioguanine	Lanvis®
		Pentostatine	Nipent®
		Cladribine	Leustatine/Litak®
		Fludarabine	Fludara®
		Clofarabine	Evoltra®
		Nélarabine	Atriance®
	Antifolate	Méthotrexate	Ledertrexate®, Novatrex®
		Pemetrexed	Alimta®
		Raltitrexed	Tomudex®
Inhibiteur topoisomérase	Topoisomérase I	irinotecan	Campto®
		Topotécane	Hycamtin®
	Topoisomérase II	Etoposide	Vépéside®, Celltop®
		Amsacrine	Amsidine®
		Daunorubicine	Cérubidine®
		Epirubicine	Farmorubicine®
		Pirarubicine	Théprubicine®
		Mitoxantrone	Novantrone®

Tableau 3 (suite) : Molécules cytotoxiques utilisées en oncologie.

Catégorie	Classe	molécule	médicament
Les poisons du fuseau	Vinca-alcaloïdes	Vinblastine	Velbé®
		Vincristine	Oncovin®
		Vindésine	Eldisine®
		Vinorelbine	Navelbine®
		Vinflunine	Javlor®
	Taxanes	Paclitaxel	Taxol®
		Docétaxel	Taxotère®
		Sunitib	Sutent®
		Gefitinib	Iressa®
		Elotinib	Tarceva®

2.4. Les thérapies anti-angiogéniques

Dès les années 70, Folkman met en évidence le rôle majeur de l'angiogenèse dans la croissance tumorale ⁵³. Au moment de la croissance tumorale, les tumeurs atteignent un point limite où l'approvisionnement en sang (oxygénation et nutriments) ne peut plus répondre aux besoins physiologique de la tumeur et conduit à des zones d'hypoxie. En réponse à cette hypoxie, la tumeur subit un *switch* angiogénique qui va favoriser le développement d'un réseau vasculaire tumoral. Le *Vascular Endothelium Growth Factor* (VEGF) est l'un des facteurs pro-angiogénique les plus critiques jouant un rôle majeur dans l'angiogenèse des tumeurs ^{54,55}.

L'angiogenèse est un phénomène complexe, résultant de l'action de facteurs pro- et anti-angiogéniques, activant des voies de signalisations en partie connues et conduisant finalement à l'activation ou à l'inhibition de la croissance des cellules endothéliales vasculaires. L'angiogenèse est régulée par un ensemble de cascades de signalisations dont la phosphorylation des protéines et la liaison du ligand à son récepteur régulent la plupart des mécanismes d'actions.

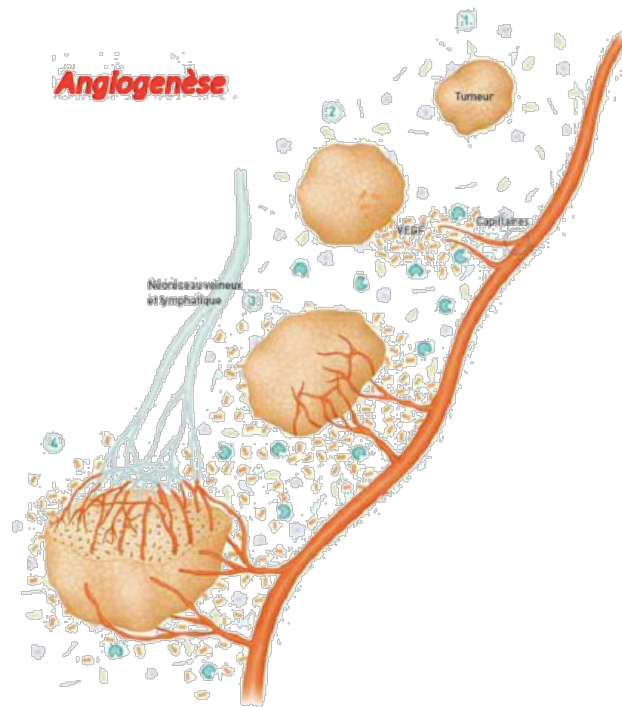


Figure 11 : Angiogenèse tumorale

C'est l'hypoxie régnant au sein de la tumeur, associée à d'autres facteurs (baisse du pH, stress oxydant,...), qui favorise la formation d'un hétérodimère, constitué de HIF-1a et HIF-1b (*Hypoxia Inducible Factors*). L'hétérodimère joue le rôle de facteur de transcription et induit la transcription de gènes cibles. Au cours du développement tumoral, les VEGF sont essentiels à la formation des néo-vaisseaux. Au sein de cette famille de protéines comprenant les VEGF-A à E, mais aussi les facteurs placentaires PlGF1 et 2, le VEGF-A (VEGF 165) est l'acteur principal. Les effets biologiques « du » VEGF nécessitent sa fixation sur des récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGF-R1 à 3) ou sans activité kinase (neuropilines NRP1 et 2). VEGF-R3 est plus spécifiquement impliqué dans la lymphangiogenèse, tandis que les VEGF-R1 et -R2 sont impliqués dans les effets mitogènes, dans l'angiogenèse et dans la perméabilité vasculaire du VEGF ; les NRP amplifient les effets des VEGF-R.

C'est tout naturellement que le VEGF a été la première cible thérapeutique de l'angiogenèse. On distingue deux types de molécules ciblant l'angiogenèse, les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de tyrosine kinase. Le bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé anti-angiogénique ciblant le VEGF et empêchant sa fixation avec son récepteur VEGF-R.

INTRODUCTION

Les inhibiteurs de tyrosine kinase sont dirigés contre des protéines, ce qui permet la modulation de différentes voies de signalisation ⁵⁶ et sont caractérisés par une toxicité non spécifique limitée ^{57,58} (tableau 5).

Les traitements anti-angiogéniques ont des effets cytostatiques et non cytotoxiques comme c'est le cas des chimiothérapies conventionnelles. On s'attend donc à ce que les effets secondaires soient moins nombreux, permettant ainsi d'augmenter les doses tolérées et une administration continue de ces traitements. Toutefois, certains anti-angiogéniques, notamment le bevacizumab, entraînent des complications thrombotiques ainsi que d'autres effets secondaires non négligeables (hypertension, saignements intra-tumoraux...) ²⁷. De plus, l'efficacité du bevacizumab est très controversée. On constate une amélioration de la survie sans progression, mais le traitement n'a aucun effet sur le survie globale ⁵⁹.

Tableau 5 : Principales molécules anti-angiogéniques approuvées par la FDA.

Type	Molécule	cible
Anticorps	Bevacizumab (Avastin®)	VEGF-A
Inhibiteur à tyrosine kinase	Sorafenib (Nexavar®)	VEGF-R1,-2,-3, PDGFR, Raf, c-kit
	Sunitinib (Sutent®)	VEGF-R1,-2, PDGFR, c-kit, Flt-3
	Vandetanib (Zactima®)	RET, VEGF-R, EGF-R
	Pazopanib (Votrient®)	VEGF-R, PDGF-R
	Everolimus (Afinitor®)	mTOR
	Cabozantinib (Cometriq®)	c-MET, VEGF-R2
	Afatinib (Gilotrif®)	EGFR, HER2
	Axitinib (Inlyta®)	VEGF-R1,-2,-3, PDGFR, c-kit
Regorafenib (Stivarga®)	VEGF-R2, TIE2	

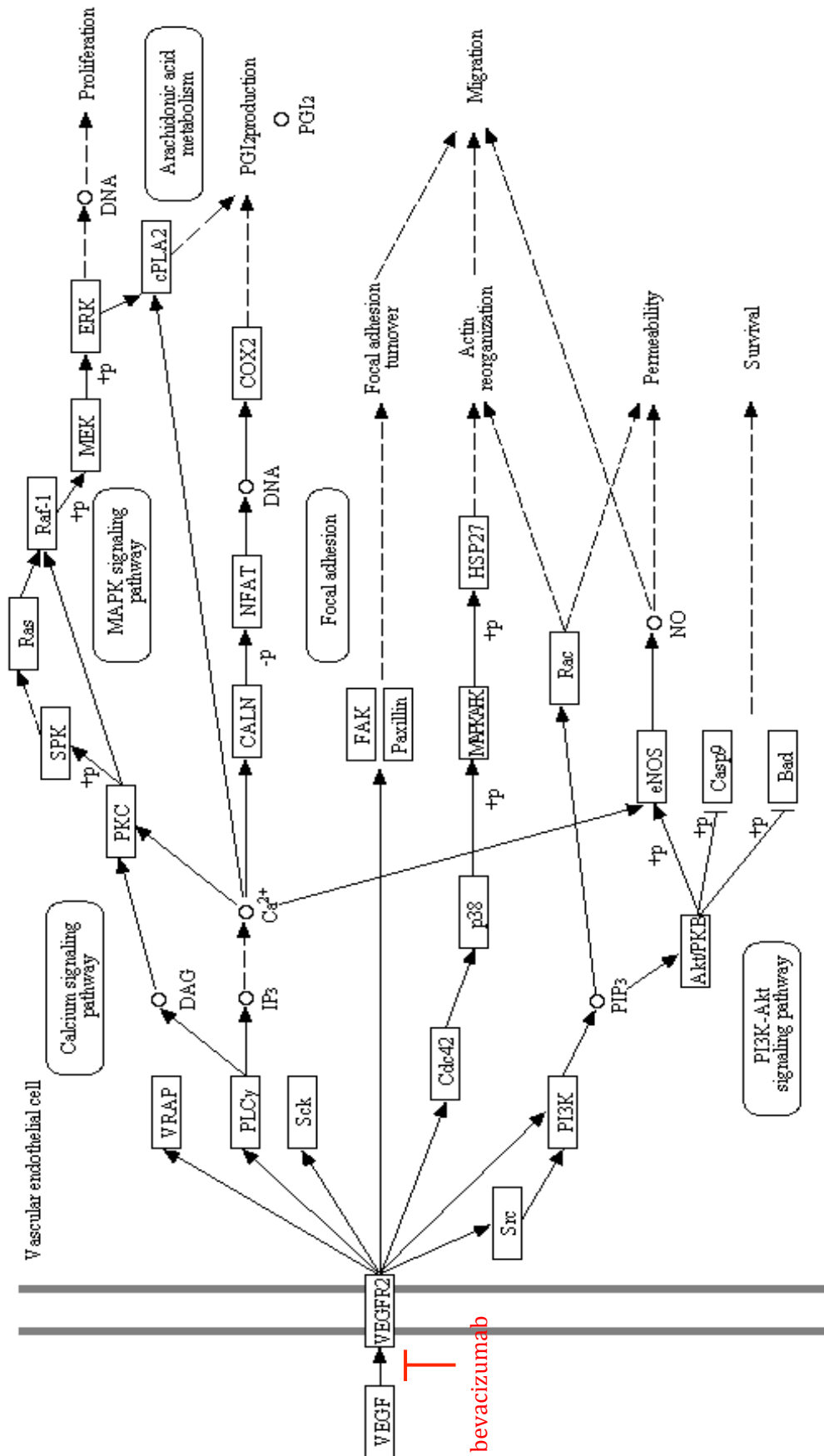


Figure 12 : Voie de signalisation induite par le VEGF et VEGFR2 (KEGG)

3. La recherche de biomarqueurs par marquage isotopique

3.1. Les biomarqueurs

3.1.1. La notion de biomarqueurs

Un biomarqueur est un paramètre biologique permettant de définir un état biologique. Cet état biologique peut-être normal ou pathologique mais peut également prédire un déséquilibre à venir.

3.1.2. Généralités

Au cours des cinquante dernières années, l'identification de biomarqueurs du cancer a contribué à des changements dans le management de la pathologie. Les biomarqueurs sont utilisés pour i) le diagnostic : pour classer les tumeurs et pour dépister les patients ii) le pronostic : pour surveiller la progression de la maladie et la réponse au traitement iii) et le prédictif : pour mettre en place un protocole thérapeutique individualisé afin d'optimiser la survie ⁶⁰.

La découverte de biomarqueurs, permettant une amélioration de la prise en charge diagnostique, pronostic et prédictif, est un enjeu majeur en cancérologie ⁶¹. Une meilleure compréhension de la biologie des gliomes a permis de mettre en évidence des signatures moléculaires de la pathologie. Les rôles de ces biomarqueurs comprennent le diagnostic des sous-types de tumoraux, l'identification de cibles thérapeutiques, la détection de la récurrence tumorale et le pronostic. Le développement de biomarqueurs dans le GBM doit relever de nombreux défis. En effet, les biomarqueurs actuels nécessitent une technique de prélèvement invasive et souvent chirurgicale, les biomarqueurs protéiques permettraient de transférer des informations en périphérie et favoriseraient ainsi le confort du patient.

L'altération de l'expression de plusieurs gènes a été mise en évidence, permettant ainsi de souligner des caractéristiques strictes des différentes sous-classes de gliome. Actuellement plusieurs biomarqueurs sont utilisés comme facteur diagnostique dans les gliomes (Tableau 3). Ces biomarqueurs moléculaires viennent compléter la classification histologique et apportent une information essentielle pour le clinicien ^{40,62}.

L'enjeu actuel est de mettre en place des biomarqueurs compagnons dans les différentes stratégies thérapeutiques mises en œuvre afin de suivre en temps réel l'efficacité du traitement et de pouvoir ajuster dans le même temps les concentrations systémiques de molécules thérapeutiques. A ce jour les différentes approches utilisées se sont révélées insatisfaisantes ^{12,13}; cette situation pourrait changer avec l'utilisation de nouveaux outils de hautes performances développés, notamment en protéomique ¹⁴.

3.2. Le marquage isotopique *in vivo*

L'utilisation de marquage isotopique dans le vivant est utilisée depuis de nombreuses années dans l'étude de la dynamique cellulaire. Dans leurs travaux, Schoenheimer et Rittenberg cherchent à suivre une molécule *in vivo* mais sont limités par la modification de la nature moléculaire qu'engendre l'ajout d'un groupement halogénure ou benzénique. Ils ont alors découvert l'intérêt d'utiliser un isotope stable de l'hydrogène, le deutérium. Incorporé sur des méthyl de chaîne d'acide gras, il ne modifie ni la structure, ni les propriétés physicochimiques de la molécule et peut-être suivi à partir des propriétés de l'eau formée lors de sa métabolisation. Ils ont ainsi pu mettre en évidence le concept de « *Breakdown and re-synthesis* » dans les années 1930 ⁶³.

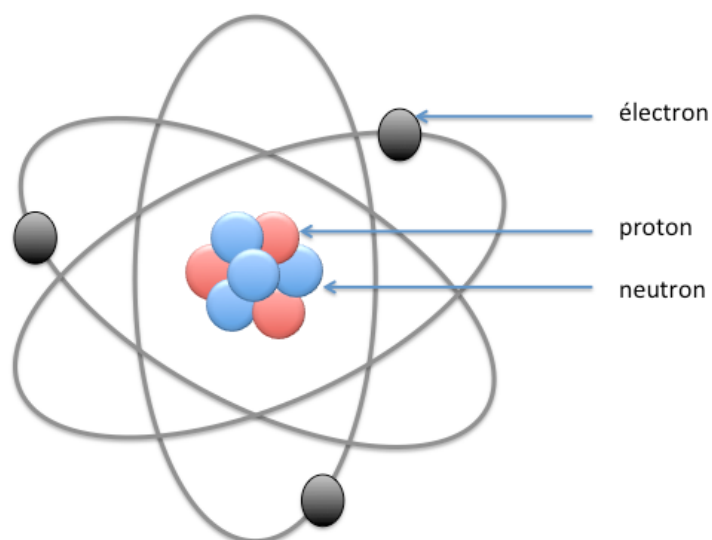


Figure 13 : Composition générale d'un atome

3.2.1. Les isotopes : définition

Découvert par JJ Thomson, les isotopes sont des formes différentes d'un même élément ayant des propriétés chimiques identiques mais des propriétés physiques différentes ⁶⁴. Les isotopes d'un atome possèdent le même nombre d'électrons et le même nombre de protons, mais un nombre de neutrons différents. On distingue les isotopes radioactifs (Carbone 11) et les isotopes stables (Carbone 12).

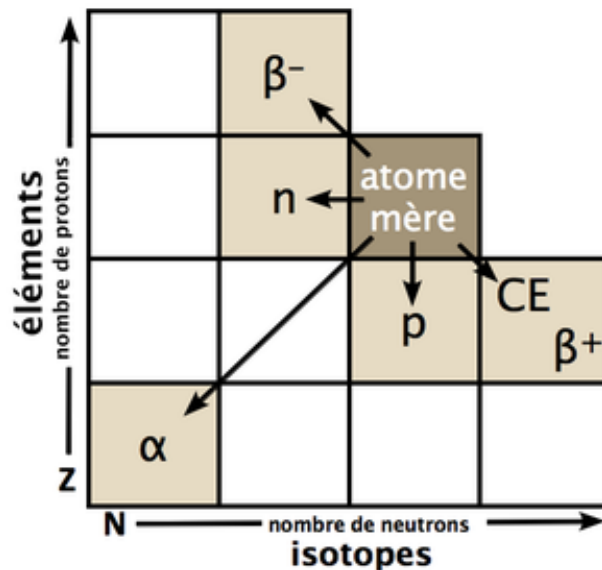


Figure 14 : schéma des transformations isobariques

3.2.2. Le marquage isotopique radioactif

L'imagerie nucléaire est utilisée depuis de nombreuses années comme technique d'imagerie fonctionnelle. Ainsi on peut facilement mettre en évidence des zones tumorales primaire ou métastatique. Différents radio-traceurs sont utilisés en imagerie nucléaire médicale. En France, le ¹⁸FDG est largement utilisé dans les diagnostics de tumeurs cérébrales (figure 1). Le marquage radioactif est suivi par des *gamma*-caméras.

La demi-vie courte de ces radioéléments est parfaitement adaptée à une utilisation biomédicale en limitant leur accumulation dans l'organisme. En contrepartie, cette demi-vie courte empêche tout suivi à long terme et incorporation fonctionnelle au sein de protéines par exemple.

Tableau 6 : Radio-isotopes utilisés en imagerie nucléaire médicale
La radioactivité β^+ ne concerne que les nucléides présentant un excès de protons. La radioactivité β^- ne concerne que les nucléides présentant un excès de neutrons. La radioactivité γ émet un photon.

Radio-traceur	Symbole	Rayonnement	Demi-vie	Utilisation
Technétium 99	^{99m}Tc	γ (141 keV)	6 h	Scintigraphie
Iode 123	^{123}I	γ (159 keV)	13 h	Scintigraphie
Fluor 18	^{18}F	β^+ (1 656 keV)	109 min	PET scan
Carbone 11	^{11}C	β^+ (3,17 MeV)	20,3 min	PET Scan

3.2.3. Le Carbone 14 : premier radio-traceur « stable ».

Les traceurs sont des outils indispensables pour la compréhension des échanges dans les cycles métaboliques. En 1940, Kamen et Ruben pallient à l'absence d'un traceur facilement détectable, en découvrant le carbone 14, un isotope radioactif du carbone avec une demi-vie longue, supérieure à 5730 \pm 40 ans^{65,66}. Il n'en existe que des traces à la surface de la Terre, mais le développement de réacteurs nucléaires en a permis la production. Lors de sa désintégration, le carbone 14 émet des rayonnements β^- et est donc plus facilement détectable. Un grand nombre d'études ont donc été menées utilisant le carbone 14 comme traceur pour l'étude du métabolisme⁶⁷⁻⁷⁰.

3.2.4. Les isotopes stables

Les atomes peuvent posséder plusieurs isotopes stables avec des abondances naturelles différentes mais une forme isotopique est prédominante. Le carbone possède deux isotopes stables, le carbone 12 et le carbone 13 dont l'abondance naturelle est respectivement de 98,9% et 1,1%. L'azote possède également deux isotopes stable, l'azote 14 et l'azote 15 représenté à hauteur de 99,64% pour le premier et de 0,364% pour le second. Ainsi un enrichissement de l'isotope minoritaire permet un marquage isotopique.

Tableau 7 : Exemple d'isotopes stables.

Isotopique	Symbole	Abondance naturelle
Carbone 13	^{13}C	1,1%
Azote 15	^{15}N	0,364 %
Deutérium	D	0,015 %
Oxygène 18	^{18}O	0,205 %

3.3. La résonance magnétique nucléaire (RMN)

Découvert par I.I.Rabi, qui lui a valu le prix Nobel en 1944, le principe de la RMN repose sur la propriété de certains noyaux atomiques à posséder un spin nucléaire placés dans un champ magnétique ⁷¹. Or tous les isotopes majoritaires ne possèdent pas de spin nucléaire. Le carbone 12 et l'azote 14 possède un spin nul. Il n'est donc pas possible de suivre ces atomes par RMN. A l'inverse, le proton (^1H) possède un spin nucléaire. Cette particularité lui confère un intérêt certains de par sa prédominance dans toutes les molécules. Aujourd'hui, la RMN du proton est utilisé en routine hospitalière par l'imagerie à résonance magnétique (IRM).

Tableau 8 : Rapport gyromagnétique

Noyau	γ (rad.T ⁻¹ .s ⁻¹)
^{19}F	2,518.10 ⁸
^{13}C	0,6728.10⁸
^{31}P	1,084.10 ⁸
^1H	2,67.10⁸

La sensibilité du carbone 13 par rapport à celle de l'hydrogène est d'environ 25% ($\gamma_{\text{C}}/\gamma_{\text{H}}$). De plus l'abondance naturelle du carbone 13 est seulement de 1,1%. L'utilisation de la RMN du carbone 13 est donc souvent limitée à des molécules très concentrées ou à la chimie. On compense ce déficit en enrichissant en carbone 13 le milieu. Les études du métabolisme sont couramment utilisées à partir de ^{13}C -glucose (glycolyse) ou d'intermédiaire du cycle de Krebs (Citrate, Succinate, fumarate).

INTRODUCTION

En 1975, une équipe de l'université de Yale aux Etats-Unis travaille sur le métabolisme de la valine dans l'acidémie méthylmalonique (maladie génétique rare due à un déficit en méthylmalonyl CoA mutase). Pour cela, ils ont utilisé de la ^{13}C -Valine chez l'homme et ont suivi les échanges entre les métaboliques du carbone 13 par résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN ^{13}C)⁷².

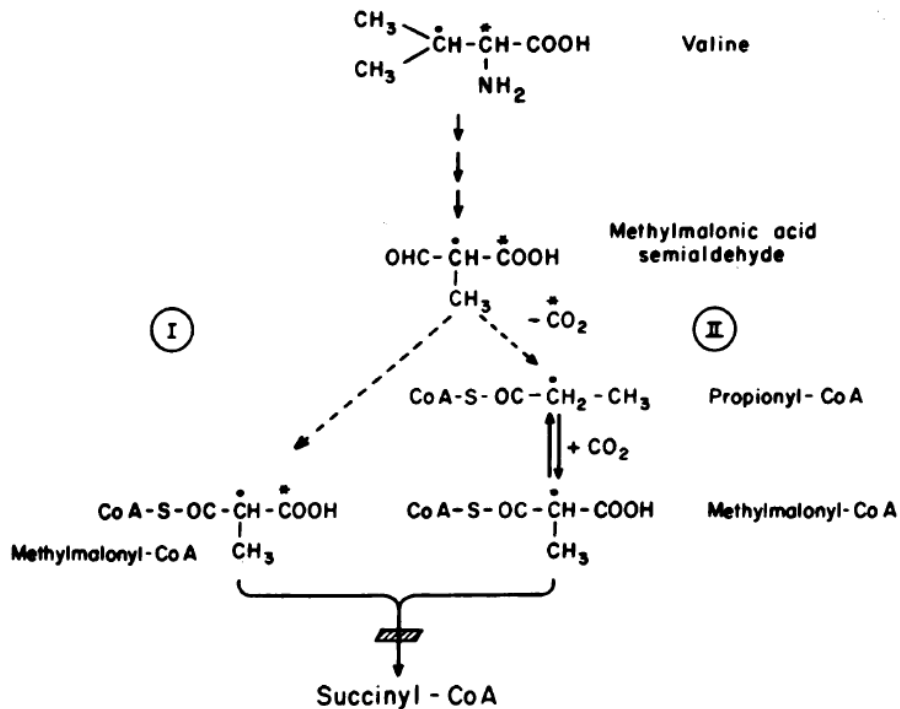


Figure 15 : Voie de dégradation de la Valine proposé par Tanaka en 1975⁷².

3.4. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique de protéomique mise en place par JJ Thomson au début du XX^e siècle. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules soumises à un champ électrique et dont la séparation de fera en fonction de leur masse et de leur charge. Un spectromètre de masse mesure le rapport masse/charge (m/z) de molécules ionisées.

L'amélioration des techniques protéomiques a fait émerger de nouvelles méthodologies innovantes ouvrant les champs des possibles à une analyse comparative d'un mélange complexe de protéines. Utilisant des marquages isotopiques stables, comme le carbone 13, on peut à présent effectuer une étude comparative de l'expression d'une protéine en

condition *in vitro* comme le SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*) ou mesurer des *turnover* protéiques *in vivo*.

3.4.1. La SRM (*Selected Reaction Monitoring*)

La technologie SRM est une technique de spectrométrie de masse permettant de quantifier une ou plusieurs protéines cibles dans un échantillon biologique complexe⁷³. Ce type d'analyse est effectué avec un spectromètre de masse de type « triple quadripôle » ou « quadripôle-trap » couplé à un système de chromatographie liquide haute performance. La SRM exploite les capacités uniques de triple quadripôle (QQQ) MS pour l'analyse quantitative. En SRM, le premier quadripôle (Q1) et le troisième (Q3) agissent comme des filtres pour sélectionner précisément des valeurs prédéfinies de m/z correspondant respectivement à l'ion peptide (Q1) et un ion fragment (Q3) spécifique de la protéine d'intérêt, tandis que le second quadripôle (Q2) sert de cellule de collision (Figure 14)⁷⁴.

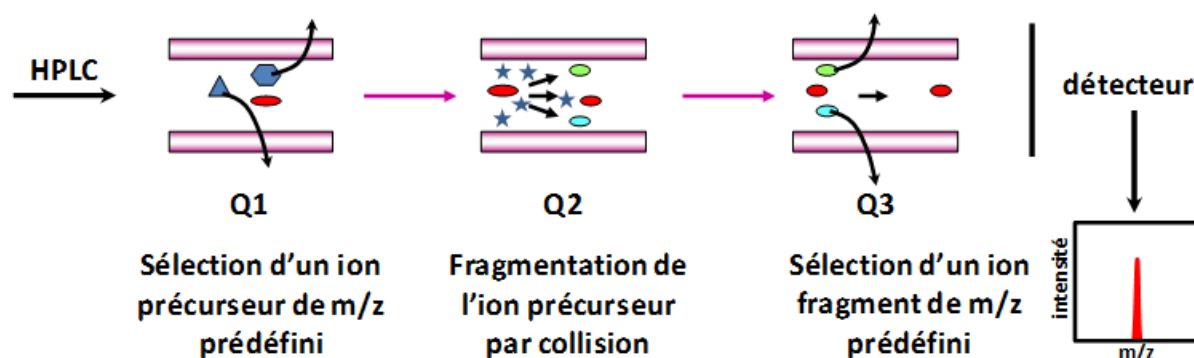


Figure 16 : Principe générale de la SRM

La spécificité analytique de la méthode SRM provient de la combinaison de la valeur de m/z de la molécule à doser et de la valeur de m/z de l'ion fragment. Pour quantifier une protéine, l'analyse de plusieurs transitions, correspondantes à différents peptides, permet d'augmenter la spécificité analytique. Cette analyse de plusieurs transitions est appelée MRM (*Multiple Reaction Monitoring*)⁷⁵.

Par ailleurs, la séparation chromatographique des peptides en amont de l'analyseur permet non seulement d'optimiser la sensibilité analytique de la méthode en diminuant la complexité

INTRODUCTION

du mélange peptidique mais également en augmentant la spécificité pour un peptide donné en ajoutant le temps de rétention chromatographique comme paramètre de sélection. Enfin, la concentration absolue d'une protéine peut être mesurée par l'approche MRM, en utilisant des peptides marqués avec un isotope lourd qui jouent le rôle de standard interne. Ce procédé est retrouvée avec les peptides AQUA ⁷⁶ ou avec le PSAQ ⁷⁷.

3.4.2. Le SILAC

Le SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) a été développé par l'équipe de Matthias Mann ¹⁶. Le principe du SILAC repose dans la comparaison de l'expression du protéome de deux populations cellulaires. Pour cela, il est nécessaire de cultiver en parallèle les deux lignées cellulaires, l'une dans un milieu « light », et l'autre dans un milieu « heavy ». Le milieu « light » est un milieu avec un marquage isotopique naturel alors que le milieu « heavy » aura eu moins un acide aminé enrichi avec un isotope stable. Les protéines synthétisées contiendront ou non l'acide aminé marqué minoritaire (carbone 13, azote 15...). Traditionnellement, le marquage se fait sur la lysine et/ou l'arginine. Ceci s'explique par la digestion trypsique qui clive les protéines après les lysines et arginines, permettant ainsi d'obtenir de façon théorique un unique marquage par peptide.

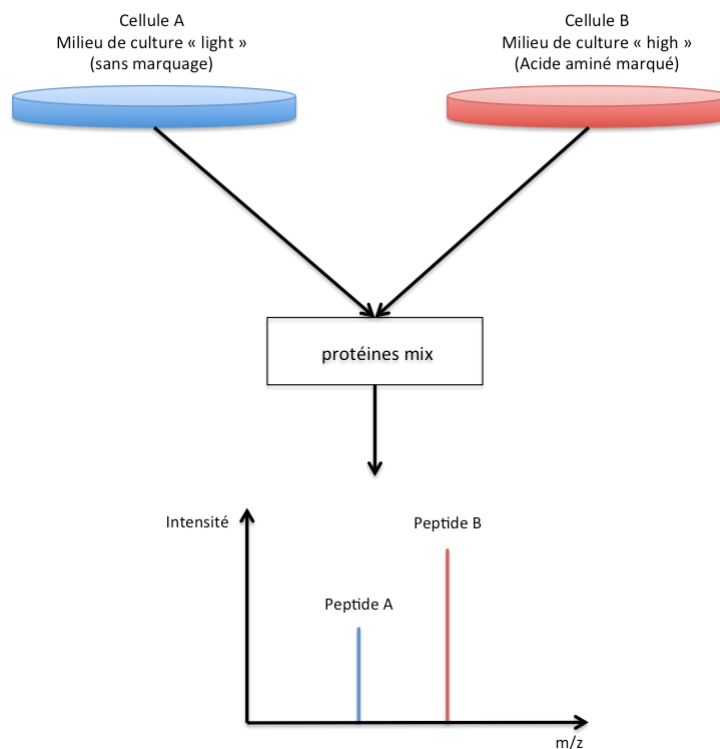


Figure 17 : Schéma représentant le principe du SILAC

INTRODUCTION

Cette technique a pu être transférée *in vivo*, permettant alors d'étudier le métabolisme physiologique et surtout sa dynamique.

3.4.3. Marquage des protéines *in vivo*

Déjà utilisé dans les années 30 dans les travaux de Schoenheimer et Rittenberg, le marquage isotopique *in vivo* n'est pas nouveau. En revanche, les techniques d'analyses ont considérablement évoluées. Alors que Schoenheimer suivait le deutérium par les propriétés de combustion des molécules d'eau lourde ($^2\text{H}_2\text{O}$), aujourd'hui, les spectromètres de masses permettent de discriminer les marquages isotopiques.

Plusieurs travaux utilisent le marquage isotopique dans l'optique d'étudier la dynamique physiologique des protéines. L'Equipe de Beynon travaille depuis plusieurs années sur le *turnover* des protéines. Ils ont réalisé un travail en 2005 sur le marquage isotopique chez le poulet. Cependant le modèle n'était pas pertinent car les poulets étaient en pleine croissance¹⁸. On retrouve également des études chez l'homme, notamment celle d'une équipe américaine qui a suivi la dynamique de bêta-amyloïde dans la maladie d'Alzheimer¹⁹.

3.5. Le *turnover* des protéines

Dans un système métabolique, les flux d'entrées de matière dans un compartiment concernent généralement des nutriments issus de la digestion ou de la mobilisation de certaines réserves, tandis que les flux de sorties représentent le plus souvent les quantités de substances des processus de dégradations et d'excrétion. Les flux d'entrée et de sortie assurent le renouvellement (ou *turnover*) de la substance présente dans le compartiment considéré.

Dans le vivant, tout est une question d'homéostasie. Il s'y opère une régulation constante de toutes les molécules actives. Une fois produite, une molécule a une durée de vie limitée et il s'en va d'un phénomène de synthèse et dégradation. Le concept de synthèse/dégradation a été mis en évidence dès les années 1930^{63,78}.

Les protéines sont en perpétuel renouvellement, bien que la concentration apparente est constante, et ce, grâce à un phénomène de synthèse/dégradation appelé *turnover* (**k**) à l'équilibre. La représentation la plus simple de ce phénomène, est la succession de trois

INTRODUCTION

compartiments. Le premier est composé des précurseurs, c'est-à-dire du pool d'acides aminés disponibles pour la synthèse des protéines, représentés dans le second compartiment. Le troisième compartiment regroupe l'ensemble des composants de la dégradation des protéines (figure 12). La synthèse et la dégradation sont définies par, respectivement, les constantes de synthèse ($k_{\text{synthèse}}$) et de dégradation ($k_{\text{dégradation}}$).

Le *turnover* (k) est dépendant de deux paramètres, la synthèse ($k_{\text{synthèse}}$) et la dégradation ($k_{\text{dégradation}}$). Le *turnover* est un phénomène très important dans le maintien de l'homéostasie. Si on considère un système à trois compartiments :

- Le pool de précurseurs $C_{\text{précurseur}}$
- Le pool de protéines $C_{\text{protéine}}$
- Le pool des produits de dégradation $C_{\text{métabolisme}}$

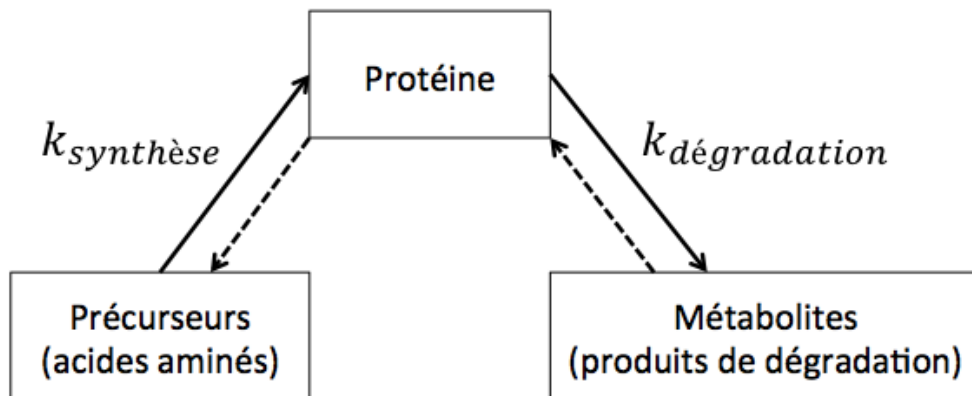


Figure 18 : Modèle à 3 compartiments simplifié dans le turnover de protéines

A l'équilibre, on peut noter :

$$\sum \text{synthèse} = \sum \text{dégradation}$$
$$k = k_{\text{synthèse}} - k_{\text{dégradation}}$$

Trois conditions sont possibles :

INTRODUCTION

- Pour une parfaite homéostasie, $k = 0$, ainsi la concentration protéique est constante, on a alors :

$$k_{\text{synthèse}} = k_{\text{dégradation}}$$

$$\frac{dC_{\text{protéine}}}{dt} = k_{\text{synthèse}}C_{\text{précurseur}}(t) - k_{\text{dégradation}}C_{\text{métabolites}}(t)$$

$$\frac{dC_{\text{protéine}}}{dt} = 0$$

- Si $k > 0$, on assiste à une accumulation de la protéine (c'est le cas dans les maladies avec un déficit enzymatique),

$$k_{\text{dégradation}} \gg k_{\text{synthèse}}$$

$$\frac{dC_{\text{métabolites}}}{dt} = k_{\text{synthèse}} \times C_{\text{métabolites}}(t) \rightarrow C_{\text{métabolites}}(t) = C_{\text{métabolites}} \times e^{-kt}$$

- si $k < 0$ signifie que le taux de protéine diminue, et que la constante de dégradation impose sa concentration

$$k_{\text{dégradation}} \gg k_{\text{synthèse}}$$

$$\frac{dC_{\text{précurseur}}}{dt} = k_{\text{synthèse}} \times C_{\text{précurseur}}(t) \rightarrow C_{\text{précurseur}}(t) = C_{\text{précurseur}} \times e^{-kt}$$

Le choix du marquage est essentiel dans l'étude du *turnover*. En effet, il faut anticiper le catabolisme des molécules marquées. Lors du catabolisme les atomes enrichis seront distribués dans la synthèse de nouvelles molécules. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser un acide aminé essentiel pour la mesure du *turnover*. Les acides aminés essentiels sont apporté exclusivement par l'alimentation et ne peuvent être synthétisés par l'organisme.

La fraction du marquage isotopique (RIA : *Relative Isotope Abundance*) est fonction de la pression du marquage effectué dans l'organisme pendant la synthèse de protéine. Ce RIA est compris entre 0 (absence de marquage) et 1 (marquage total). Afin de parvenir à un

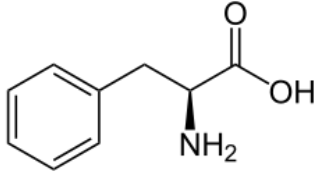
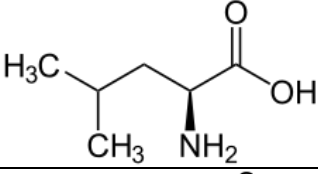
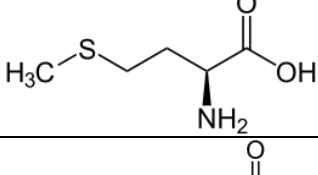
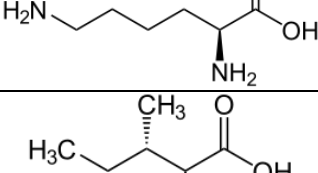
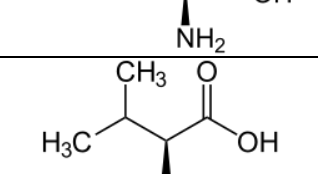
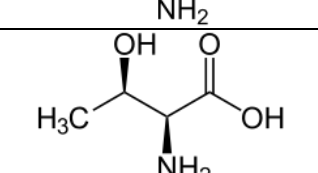
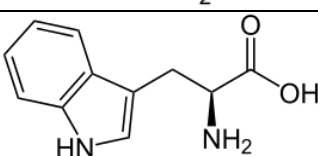

INTRODUCTION

marquage de 100%, il est nécessaire de réaliser un marquage sur plusieurs générations, le marquage total est alors atteint à la génération F2 ⁷⁹.

Pour la mesure du *turnover*, il n'est pas utile d'atteindre un marquage à 100%. Il faut définir au préalable le marquage maximal que l'on peut espérer en définissant le RIA maximal (RIA_{∞}). Le RIA_{∞} correspond au niveau d'enrichissement en acide aminé marqué dans le tissu étudié ⁸⁰, il dépend essentiellement de la pression du marquage. La vitesse d'atteinte du plateau est protéine dépendante. Il dépend essentiellement du *turnover* de la protéine. Une protéine avec un *turnover* rapide atteindra le RIA_{∞} plus rapidement et inversement (Figure 13). Si le RIA précurseur est égal à 0,5, alors, seulement 50% des acides aminés utilisés pour le marquage des nouvelles protéines seront marquées, il sera donc nécessaire d'appliquer une correction pour avoir une estimation du taux global.

INTRODUCTION

Tableau 9 : Acides aminés essentiels pour l'homme

Nom	Code	Doses journalières recommandées pour les adultes (mg/kg)	Structure
Phénylalanine	F	25	
Leucine	L	39	
Méthionine	M	15	
Lysine	L	30	
Isoleucine	I	20	
Valine	V	28	
Thréonine	T	15	
Tryptophane	W	4	

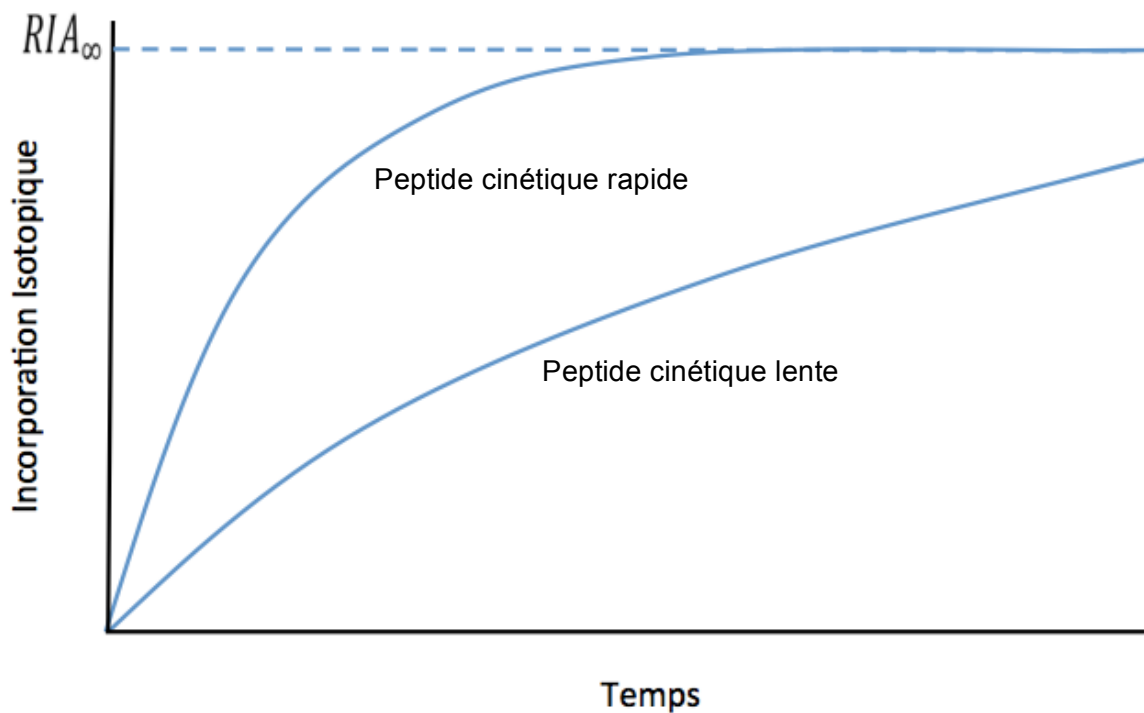


Figure 19 : Variation de l'abondance isotopique relative (RIA) au cours du temps durant un marquage continu.

Pour calculer le RIA_{∞} , on utilise un peptide possédant deux sites de marquages. Ce peptide possède alors deux positions d'incorporation de marquage (H) et possède trois pics en spectrométrie de masse. Ces pics correspondent au peptide non marqué (LL), au peptide avec un marquage (LH ou HL) et un pic correspondant au peptide doublement marqué (HH). Si r est le RIA_{∞} alors les probabilités d'obtenir ces différentes conformations sont ⁸¹ :

$$I_{LL} = (1 - r)^2$$

$$I_{HL} = I_{LH} = 2 \times r(1 - r)$$

$$I_{HH} = r^2$$

INTRODUCTION

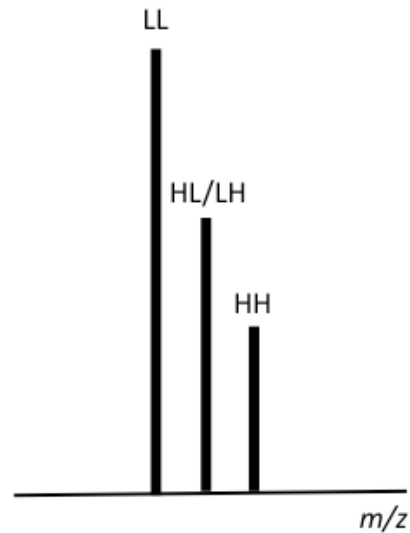
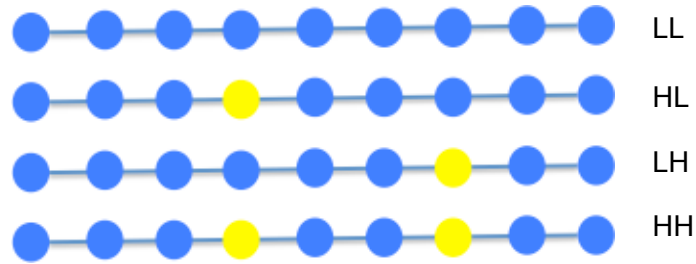


Figure 20 : Position de marquage possible sur un peptide avec deux positions de marquage. Spectre MS associé.

Le *ratio* des intensités des peptides marqués est donc :

$$\frac{I_{HH}}{I_{HL} + I_{LH}} = \frac{r^2}{2r(1-r)} = \frac{r}{2(1-r)}$$

Si :

$$x = \frac{I_{HH}}{I_{HL} + I_{LH}}$$

Alors

$$r = \frac{2x}{1 + 2x} = RIA_{\infty}$$

Le RIA_{∞} est ainsi obtenu et fixé pour le tissu étudié. Il est fonction du marquage effectué. Il est alors possible de calculer le *turnover* k de chaque protéine à partir de peptides avec un unique site de marquage. Pour cela, il est nécessaire de calculer l'incorporation isotopique relative (RIA_t). Pour un peptide a un site de marquage, seule deux conditions de marquage sont possibles : marqué (H) ou non marqué (L). On obtient donc :

INTRODUCTION

$$RIA_t = \frac{I_H}{I_H + I_L}$$

Le *turnover* k est défini en fonction du RIA_∞ et du temps t , on obtient donc :

$$RIA_{(t)} = RIA_\infty \times (1 - e^{-kt})$$

$$k = \frac{-\text{Ln}\left(1 - \frac{RIA_{(t)}}{RIA_\infty}\right)}{t}$$

On peut noter que le calcul du *turnover* ne peut se faire que pendant la phase d'incorporation du marquage et ne peut plus être réalisée pendant la phase d'équilibre du RIA. Durant la phase d'incorporation on considère la dégradation nulle.

PARTIE 1 :

Les anticorps monoclonaux
thérapeutiques : le bevacizumab

De l'amélioration des connaissances en biologie cellulaire et moléculaires ont émergé de nouvelles techniques⁸². Ainsi, la production à la demande d'anticorps monoclonaux a permis d'élargir les stratégies thérapeutiques comme avec les anticorps monoclonaux. Les anticorps monoclonaux sont produits à partir d'un unique lymphocyte B, immortalisé par fusion avec une cellule myéloïde. Ce procédé a été mis au point par Köhler en 1975⁸³.

Alors que les chimiothérapies ont un effet global mais une importante toxicité, les anticorps monoclonaux sont hautement spécifiques. On parle de thérapies ciblées et auraient donc une toxicité limitée. Les débuts n'ont pas été concluants, en effets, les premiers essais cliniques avec des anticorps monoclonaux ont été réalisés à partir d'anticorps murins. Produit à partir d'une espèce différente, ces anticorps entraînaient rapidement une réaction immunologique chez les patients. Le développement du génie génétique a permis d'apporter progressivement les améliorations nécessaires qui ont tout d'abord reposées sur des anticorps chimériques, puis humanisés et enfin humains, rendant les réactions immunes quasi inexistantes.

Les anticorps monoclonaux ont pris place dans le traitement standard de nombreuses formes de cancers. L'effet thérapeutique d'un anticorps monoclonal est déterminé par sa spécificité et son affinité pour sa cible mais également de son immunogénicité. En oncologie, les anticorps monoclonaux ciblent essentiellement les facteurs de croissance en inhibant les récepteurs transmembranaires (EGFR, HER2) ou des cellules endothéliales (VEGF). Les anticorps monoclonaux présentent une série d'effets secondaires liée principalement à la fonction de leur cible. Ce sont des éléments essentiels à contrôler lors de l'utilisation de ce type de molécule thérapeutique.

Tableau 10 : Anticorps monoclonaux en cancérologie ⁸⁴

DCI	Nom Commercial	Cible	Effets indésirables
cetuximab	Erbitux®	EGFR	Réactions lors de la perfusion, Rash acnéiforme, Mucites, diarrhée
panitumumab	Vectibix®	EGFR	Rash acnéiforme, Mucites, diarrhée
trastuzumab	Herceptin®	ERB2	Réaction à la première injection, Cardiomyopathie
bevacizumab	Avastin®	VEGF-A	Hypertension artérielle, protéinurie, thrombose veineuses et artérielles, hémorragies

1. Exemple du bevacizumab

Le bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal de type IgG1 qui se lie au VEGF (*Vascular Endothelium Growth Factor*) et inhibe de ce fait la liaison du VEGF à ses récepteurs, Flt-1 (VEGFR-1) et KDR (VEGFR-2), situés à la surface des cellules endothéliales aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Il est constitué d'une partie constante humanisée et d'une partie variable d'origine murine.

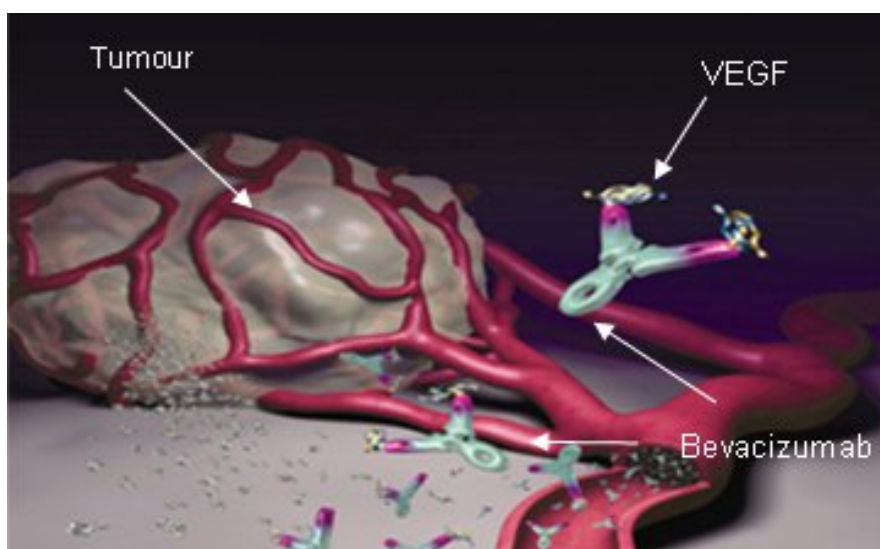


Figure 21 : Mode d'action du bevacizumab sur l'angiogenèse.

Le bevacizumab est la première molécule anti-angiogénique autorisée sur le marché par l'agence américaine du médicament (FDA) en 2004⁸⁵. Il se lie au VEGF, facteur clé de la vasculogénèse et de l'angiogénèse, inhibant de ce fait la liaison du VEGF à ses récepteurs à la surface des cellules endothéliales. La neutralisation de l'activité biologique du VEGF fait régresser et normalise les vaisseaux tumoraux, limitant ainsi l'angiogénèse tumorale, inhibant la croissance tumorale. Cette stratégie thérapeutique repose sur la théorie de Folkman, qui dès 1971, il met en évidence le rôle majeur de la vascularisation dans la croissance tumorale. Ainsi une altération de la vascularisation tumorale permettrait une inhibition de la croissance des tumeurs solides⁵³.

Le bevacizumab est utilisé dans le traitement de nombreux cancers et depuis 2009 dont les glioblastomes⁸⁶. Il est administré de façon standard par voie intraveineuse à raison de 10 mg/kg tous les 15 jours en thérapie adjuvante ou en récidive. Aucune donnée biologique n'est alors utilisée pour suivre l'efficacité du traitement. Seul une IRM de contrôle à 3 mois permet de suivre l'évolution de la croissance tumorale. On remarque cependant une grande hétérogénéité dans la réponse au bevacizumab.

La concentration d'anticorps et la cinétique d'élimination de l'anticorps monoclonal sont modulées par plusieurs paramètres (poids corporel, le sexe, la fonction hépatique)^{87,88}. Ainsi, le suivi de la pharmacocinétique du bevacizumab pourrait expliquer la variabilité interindividuelle observée chez les patients. En effet, bien qu'une demi-vie du bevacizumab soit la référence dans l'administration (20 jours), il a été montré une variation importante de celle-ci pouvant varier de 11 à 50 jours⁸⁹. Or l'apparition d'effets secondaires grave, essentiellement des troubles vasculaires (phlébite, hémorragie) entraînant l'arrêt du traitement²⁷. Ces effets secondaires pourraient être liés à des concentrations thérapeutiques inadaptées.

Ceci pourrait s'expliquer par une demi-vie du bevacizumab variant de 11 à 50 jours sans pour autant que ce paramètre soit pris en compte dans l'administration. On peut tout à fait imaginer, qu'un patient ayant une cinétique lente accumule l'anticorps thérapeutique à des doses bien supérieures à la dose optimale biologique entraînant des complications. A l'inverse, un patient avec une cinétique rapide, sera sous dosé et l'efficacité de l'anticorps sera négligeable. Dans ce travail, nous avons suivi les variations de concentrations sériques de bevacizumab chez une cohorte de patient. Ce travail a comme objectif de proposer une personnalisation du dosage de bevacizumab chez les patients afin de limiter les effets secondaires liés à des surdosages et d'anticiper les dosages trop faibles pour optimiser le traitement.

2. Article

Monitoring Monoclonal Antibody Delivery in Oncology: The Example of Bevacizumab

Guillaume Nugue^{1,3}, Marie Bidart^{1,2,3}, Marie Arlotto^{1,3}, Mireille Mousseau^{1,2,3}, François Berger^{1,2,3}, Laurent Pelletier^{1,2,3*}

1 Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France, **2** Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France, **3** Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Abstract

Developing therapeutic monoclonal antibodies paves the way for new strategies in oncology using targeted therapy which should improve specificity. However, due to a lack of biomarkers, a personalized therapy scheme cannot always be applied with monoclonal antibodies. As a consequence, the efficacy or side effects associated with this type of treatment often appear to be sporadic. Bevacizumab is a therapeutic monoclonal antibody targeting Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). It is used to limit tumor vascularization. No prognosis or response biomarker is associated with this antibody, we therefore assessed whether the administration protocol could be a possible cause of heterogeneous responses (or variable efficacy). To do this, we developed a bevacizumab assay with a broad sensitivity range to measure blood bevacizumab concentrations. We then analyzed bevacizumab concentrations in 17 patients throughout the first quarter of treatment. In line with previously published data, average blood concentrations were 88 ± 27 mg/L following the first dose administered, and 213 ± 105 mg/L after the last (6th) dose administered. However, the individual values were scattered, with a mean 4-fold difference between the lowest and the highest concentration for each dose administered. We demonstrated that the bevacizumab administration schedule results in a high inter-individual variability in terms of blood concentrations. Comparison of assay data with clinical data indicates that blood concentrations above the median are associated with side effects, whereas values below the median favor inefficacy. In conclusion, bevacizumab-based therapy could benefit from a personalized administration schedule including follow-up and adjustment of circulating bevacizumab concentrations.

Citation: Nugue G, Bidart M, Arlotto M, Mousseau M, Berger F, et al. (2013) Monitoring Monoclonal Antibody Delivery in Oncology: The Example of Bevacizumab. PLoS ONE 8(8): e72021. doi:10.1371/journal.pone.0072021

Editor: Rossella Rota, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Italy

Received: December 7, 2012; **Accepted:** July 11, 2013; **Published:** August 12, 2013

Copyright: © 2013 Nugue et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: laurent.pelletier@ujf-grenoble.fr

2.1. Introduction

Over the last decade, significant advances have been made in the care of cancer patients. Oncology's therapeutic arsenal has been expanded through the emergence of monoclonal antibodies (mAbs). mAbs are produced by a single B cell immortalized by fusion with a myeloma cell, in a process developed by Kohler in 1975⁸³. In contrast to chemotherapy, which has remarkable effects but significant toxicity, mAbs have the advantage of being highly specific. They thus represent a targeted therapy, and are likely to have limited toxicity and be applicable as part of a personalized medicine strategy.

The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pathway was recognized as a key regulator of angiogenesis in. This led to the development of several VEGF-targeting agents, including bevacizumab (Avastin®, Roche-Genentech). Bevacizumab is a humanized anti-VEGF monoclonal antibody, which neutralizes VEGF. It thus inhibits angiogenesis and limits tumor growth^{53,90}. Bevacizumab was the first anti-angiogenesis agent approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of metastatic colorectal cancer in 2004⁹¹. Since then, bevacizumab has received additional FDA approval, including for glioblastoma in 2009⁸⁶.

Despite an overall benefit of bevacizumab in the treatment of different tumors, clinical outcomes can be highly variable, with some patients responding remarkably well to anti-angiogenic therapy, while others do not^{92,93}. Furthermore, side-effects such as vascular disorders (bleeding, phlebitis, embolism) often lead to definitive cessation of the treatment²⁷.

Because of this heterogeneous response, the real clinical impact of bevacizumab remains unclear. For example, although bevacizumab delays the progression of brain and breast cancers, it does not improve overall survival^{94,95}.

One way of assessing the clinical efficacy of a drug is to characterize its pharmacokinetics (PK). The antibody concentration and the kinetics of monoclonal antibody elimination are modulated by several parameters (body weight, gender, liver function)^{87,88}. Thus, modulation of the PK of bevacizumab could explain the inter-individual variability observed in patients. Roche-Genentech have reported a mean half-life of bevacizumab close to 20 days, however, large individual differences were noted, with a half-life ranging between 11 and 50 days. In spite of this, a standardized administration protocol is recommended. Presumably, inter-individual variability in bevacizumab PK could cause variable responses to the treatment. When treatment is administered every other week, a patient for whom the half-life is 50 days would present an excess of circulating antibody from the second dose. This could be the reason for the vascular disorders noted as side effects during therapy. In contrast, a patient for whom the half-life is only 11 days will rapidly clear bevacizumab, and this could impede treatment efficacy. Since the dawn of the therapeutic mAb era, personalized treatment regimes have not been applied, despite significant PK variability. Rapid assays must therefore be developed to monitor concentrations in patients' blood during treatment. This will allow the dose of the drug to be adapted to the patient's own pharmacokinetic profile. This is essential if a real therapeutic effect is to be observed. A first step in this process requires precise monitoring of bevacizumab concentrations throughout treatment. In this

article, we describe an assay based on suspension array technology⁹⁶. The assay we have developed is sensitive, rapid, accurate and adapted to clinical use. The approach was validated by evaluating bevacizumab blood levels in a cohort of brain- and breast-cancer patients treated with bevacizumab.

2.2. Materials and Methods

2.2.1. Patients

Patients included in this study were men and women between 39 and 79 years old, treated with bevacizumab for brain- or breast-cancer (n=17). For the pharmacodynamic study, patients with breast cancer were excluded (n=3) and clinical data was confidential for one brain tumor patient. Analysis was therefore performed on 13 glioma patients. All patients provided written informed consent for participation in this study (CBR.GSI.ENR.003 V4, Grenoble University Hospital). The informed consent document and the study as a whole were approved by the hospital ethics committee (COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES).

2.2.2. Treatment and samples

Bevacizumab was intravenously infused at 10 mg/kg of body weight every two weeks. Blood samples were taken just before bevacizumab infusion.

2.2.3. Bead coupling

Recombinant human VEGF (2-10 µg; PHC9393; Invitrogen) was conjugated to Bio-Plex COOH Pro Magnetic beads (Bio-Rad). Briefly, beads were washed once in washing buffer (PBS, 0.05% tween-20, pH 7.4). Beads were incubated under slow rotation with activation buffer (0.1 M NaH₂PO₄, pH 6.2), 5 mg/ml S-NHS (P24510; Thermo Scientific) and 5 mg/ml EDAC (P77149; Thermo Scientific) for 20 min at room temperature (RT), and washed twice in PBS. Beads were then incubated for 2 hours with rhVEGF in PBS, with mixing by rotation at RT. Beads were washed once in washing buffer and incubated for 30 mins in blocking buffer (PBS, 1% BSA, 0.05% Sodium Azide, pH 7.4). Beads were stored at 4 °C in storage buffer (PBS, 1% BSA, 0.05% Sodium Azide, pH 7.4).

2.2.4. Bevacizumab Assay Procedure

Bevacizumab was assayed by suspension array technology. Briefly, 5,000 VEGF-beads were deposited per well in Bio-Plex pro flat-bottom plates (Bio-Rad). Beads were washed twice with 75 µl of wash buffer (PBS-0.05%Tween-20, pH 7.4) on a wash station (Bio-Plex Pro II; Bio-Rad). Beads were then incubated with appropriately PBS-diluted serum for 30 min under slow agitation at RT. Beads were then washed three times on a wash station and incubated with phycoerythrin-conjugated (PE) anti-human IgG (Sigma-Aldrich) for 30 min under slow agitation at RT. Beads were once again washed three times on a wash station. PE binding was measured on a Bio-Plex 220 (Bio-Rad) and analyzed using Bio-Plex Manager 5.0 software (Bio-Rad). Bevacizumab used as standard was purchased from Roche-Genentech, and stored at 4 °C.

2.2.5. Assay Validation

Assay characterization and validation was performed according to the guidelines for method validation in medical biology ⁹⁷. Briefly, the lowest limit of quantification (LLOQ) was calculated as the mean signal background plus three standard deviations. The highest limit of quantification (HLOQ) was calculated as the mean maximum fluorescence minus three standard deviations. The coefficient of variation (CV) was calculated for each concentration point by dividing the mean by the standard deviation. The inaccuracy (or bias) was calculated for each concentration point as the mean minus the value divided by the value.

2.2.6. Statistical analysis

Graphpad Prism software (version 4) was used for statistical analysis. The bevacizumab concentration parameter was compared for each patient sample using the Kruskal-Wallis test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

2.3. Results

2.3.1. Developing and validating the bevacizumab assay

The first step of our work was to develop a bevacizumab assay using a suspension array. This required covalent linkage of rhVEGF to beads which could then be used to trap

bevacizumab in samples. Bevacizumab binding was quantified using a PE-conjugated secondary antibody directed against human IgG.

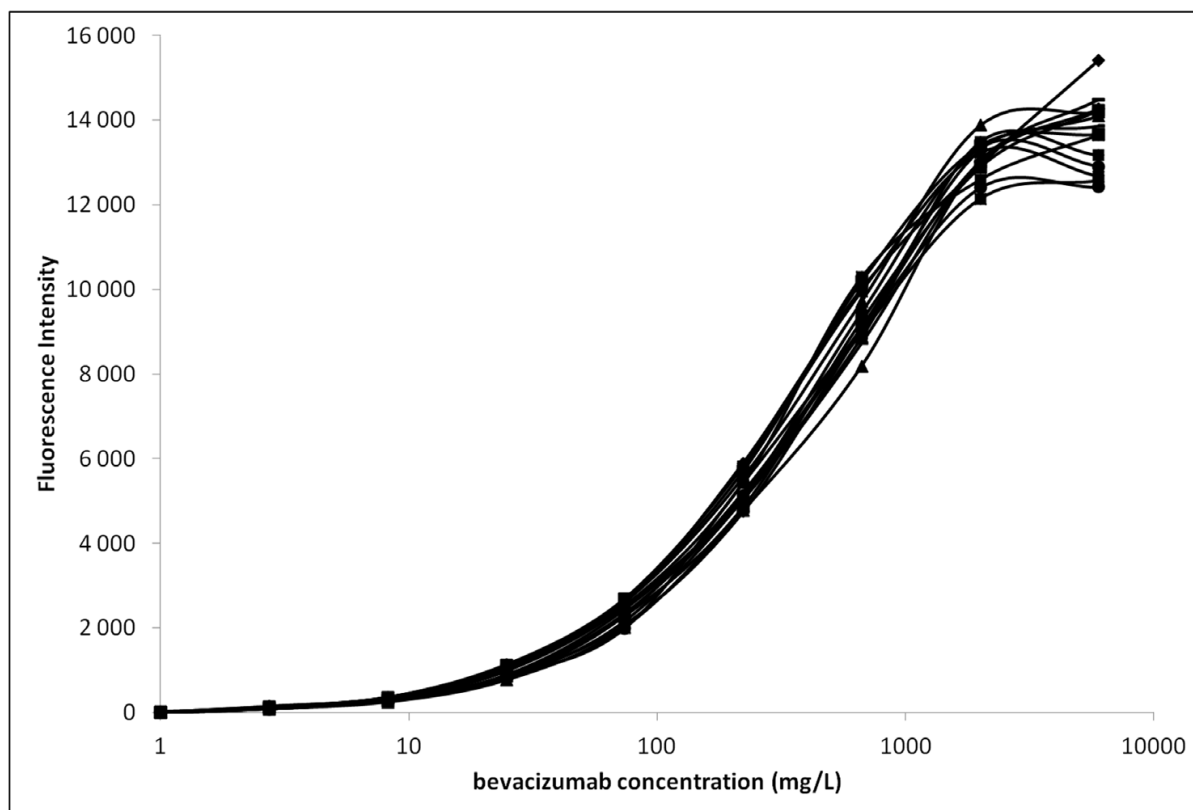


Figure 22 : Bevacizumab assay calibration. Fluorescence intensity was measured on 15 independent assays over a large bevacizumab range (0 - 6 mg/mL).

In line with the instructions for the Bio-Plex amine coupling kit (Bio-Rad), we adapted several parameters (number of beads per well, amount of rhVEGF coupled to beads, secondary antibody concentration) to optimize the assay. The maximum of this range corresponds to twice the maximum expected bevacizumab concentration in serum. For our assay, we chose to coat beads with 10 μ g rhVEGF (see material and methods section), to use 5,000 beads per well and 1,000-fold diluted sample.

Next, we qualified the assay by defining LHOQ, LLOQ, CV and inaccuracy (or bias) (Table 1). These parameters were defined on a series of 15 independent assays (figure 1). The CV varied from 6 to 25% over the 0.001 mg/L to 6 mg/L range and remained below 15% from 0.008 to 6 mg/L. According to the guidelines for biomedical assays, the assay is valid only with a CV below 15%. Our assay is therefore valid from 0.008 to 6 mg/L. The LLOQ and LHOQ were determined as 0.008 and 1 mg/L, respectively, and the bias defining accuracy was 1.48% (+/- 1.83).

2.3.2. Variable bevacizumab pharmacokinetics in patients

Once we had developed and validated our assay, we measured bevacizumab concentrations in patient sera. Seventeen patients were analyzed over the first three months of bevacizumab treatment (6 complete treatment cycles; Table 2). Blood samples were taken just before bevacizumab administration every second week. Before treatment was initiated, no bevacizumab was detected in serum. As expected, following repeated administration, the serum concentration reached a steady state. At the sixth dose, the concentration was precisely 95% of the plateau value (figure 2). If the half-life for bevacizumab is 20 days (Roche-Genentech data) and 10 mg/kg is administered at each dose, the plateau for bevacizumab concentration should shift from 203 mg/mL to 330 mg/L, just before and just after administration, respectively. The concentration measured at the plateau just prior to administration was 213+/-105 mg/L, which is very close to the theoretical value.

When we consider individual data rather than the mean concentration for the population, we observed extensive dispersion. For example, concentrations were between 54 and 149 (88+/-27) mg/L and 73 and 411 (213+/-105) mg/L for the first and the last doses, respectively. Thus, the ratio between the lowest and highest value was 2.8 and 5.6, respectively. This is representative of all the results, which have an overall ratio of 4.3.

Tableau 11 : Validation of bevacizumab assay (n=15). The coefficient of variation (CV) was calculated for each concentration point by dividing the mean by the standard deviation. The assay was validated for CVs under 20% (bold). Inaccuracy (bias) was calculated (mean minus value divided by value) only over the validated range. NA: not applicable

bevacizumab (mg/L)	CV (%)	Bias (%)
6	6.03	NA
2	6.43	4.51
0.7	6.86	3.11
0.2	6.99	0.04
0.07	10.03	-0.6
0.025	12.87	2.25
0.008	12.15	0.01
0.003	20.28	0.47
0	24.92	NA

2.3.3. Identifying serum bevacizumab levels as a pharmacodynamic marker

Patients were then classed in three groups according to clinical data: patients with side effects, non-responders and good responders. The side effects group (n=5) was defined as patients with vascular complications, in particular epistaxis, gastrointestinal hemorrhage and high blood pressure. One case of phlebitis was also associated with the highest serum bevacizumab level (355 mg/L). The non-responder group (n=4) presented residual angiogenesis, as assessed by MRI after three months of treatment. Patients who did not have any residual angiogenesis nor side effects were defined as good responders (n=4). Remarkably, low serum bevacizumab concentrations were associated with a lack of efficacy, while high concentrations were associated with side effects (figure 3). Comparison of mean variances confirmed that the mean concentrations were significantly different in the three clinical groups ($p < 0.05$). When the mean concentrations were examined for each dose, the groups appeared significantly different for doses 5 ($p < 0.05$) and 6 ($p < 0.01$). For both these doses, the side effects group was associated with the highest concentrations (254 \pm 13mg/L and 333 \pm 11mg/L, respectively); the non-responder group had the lowest concentrations (153 \pm 13mg/L and 200 \pm 35mg/L, respectively); and the responder group was associated with intermediate concentrations (216 \pm 37mg/L and 218 \pm 0mg/L, respectively). Thus, serum bevacizumab concentration appears to be a useful clinical pharmacodynamic marker.

2.4. Discussion

Whatever the biological status of patients, mAb therapies are nearly always applied using a standardized administration protocol, without personalization. This study aimed to determine whether adapting bevacizumab administration only on the basis of the patient's physical parameters (weight) could lead to treatment discrepancies.

To do this, we first developed a bevacizumab immunoassay using suspension array technology for rapid, sensitive measurement of this mAb in patient's serum. Our bevacizumab assay can be completed in 2 hours, which is a significant improvement over the 6 hours required for a similar ELISA⁹³. The ELISA is accurate and reproducible between 5 and 75 mg/L⁹³. Our test is also accurate and reproducible, but over a more clinically relevant quantification range (0.008 to 6 mg/L) with a CV below 15%. Our multiplex bevacizumab assay is therefore readily adaptable to clinical practice. Moreover, in contrast with ELISA, our assay can be used for multiplexed assays⁹⁶. For example, it would be highly relevant to simultaneously measure bevacizumab and its circulating target, VEGF.

Tableau 12 : Patient characteristics. Serum bevacizumab concentrations were determined at the plateau (70 days; values labeled with an asterisk correspond to 56 days). M: Male; F: Female.

Patient	Age	Sex	Weight	Disease	Treatment	Bevacizumab at 70 days (mg/L)
1	78	F	–	Breast cancer	Paclitaxel-bevacizumab	93
2	60	M	64	Glioma	Bevacizumab	380*
3	49	F	57	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	252
4	58	M	75	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	205
5	56	M	69	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	229*
6	52	M	79	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	166
7	41	M	–	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	283*
8	50	M	74	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	121*
9	61	M	71	Glioma	Bevacizumab	313
10	56	F	102	Breast cancer	Paclitaxel-bevacizumab	131
11	59	M	63	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	213
12	58	M	–	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	289
13	53	M	79	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	350
14	51	F	72	Breast cancer	Paclitaxel-bevacizumab	348
15	58	M	86	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	355
16	56	F	82	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	175
17	64	M	82	Glioma	Irinotecan-bevacizumab	267

This assay was then used to monitor bevacizumab PK in a cohort of 17 glioma or breast cancer patients treated with bevacizumab. The mean concentration for our cohort was close to the previously reported theoretical concentration with intravenous infusion every two weeks at 10 mg/kg body weight (figure 2). However, we observed a wide range of serum bevacizumab concentrations with the same administration regime. For example, the concentrations ranged from 54 to 149 mg/L before the second dose, and from 73 to 411 mg/L before the final (sixth) dose was administered. These results emphasize that patients treated by applying the same protocol (10 mg/kg of body weight) do not benefit from the same efficacy of treatment.

Limited PK and pharmacodynamics data has been published on bevacizumab, and most of the information available is supplied by Roche-Genentech. Moreover, inter-individual PK variability is generally not taken into account since PK is measured as the mean for a population, and is then used to determine which dose should be given to all individuals. We must now reevaluate this parameter for bevacizumab therapy. The PK parameters for bevacizumab are similar to those for IgG, for which body weight is the covariate with the greatest influence on interpatient variance⁹⁸. This supports a treatment schedule design based on body weight. However, gender, which is associated with a difference in muscular mass; tumor burden, which correlates with a faster bevacizumab clearance⁹⁹; or serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), indicative of impaired liver function, could also be assessed as covariates. In the Roche-Genentech study, slight differences in clearance were noted as a function of these factors. However, other factors should also be studied. For example, recycling of the neonatal Fc receptor (FcRn) is a common rescue pathway for monoclonal antibodies that leads to a long half-life¹⁰⁰. In 2008, Lu et al.⁹² described a

mathematical model to address the variability of bevacizumab PK based on five parameters (body weight, gender, albumin, alkaline phosphatase, and SGOT). They found weight and gender to be the covariates with the greatest influence on bevacizumab PK⁹². Nonetheless, these mathematical models have limits as they cannot take all possible covariates into account. For example, serum VEGF concentrations could affect bevacizumab clearance. To check this, we measured serum VEGF levels, but no correlation with PK was found (data not shown). In addition, mathematical models require numerous parameters, which are not always easy to provide in a clinical context. For simple optimization of bevacizumab scheduling and to eliminate covariation, we suggest using our bevacizumab immunoassay as a global biomarker of PK.

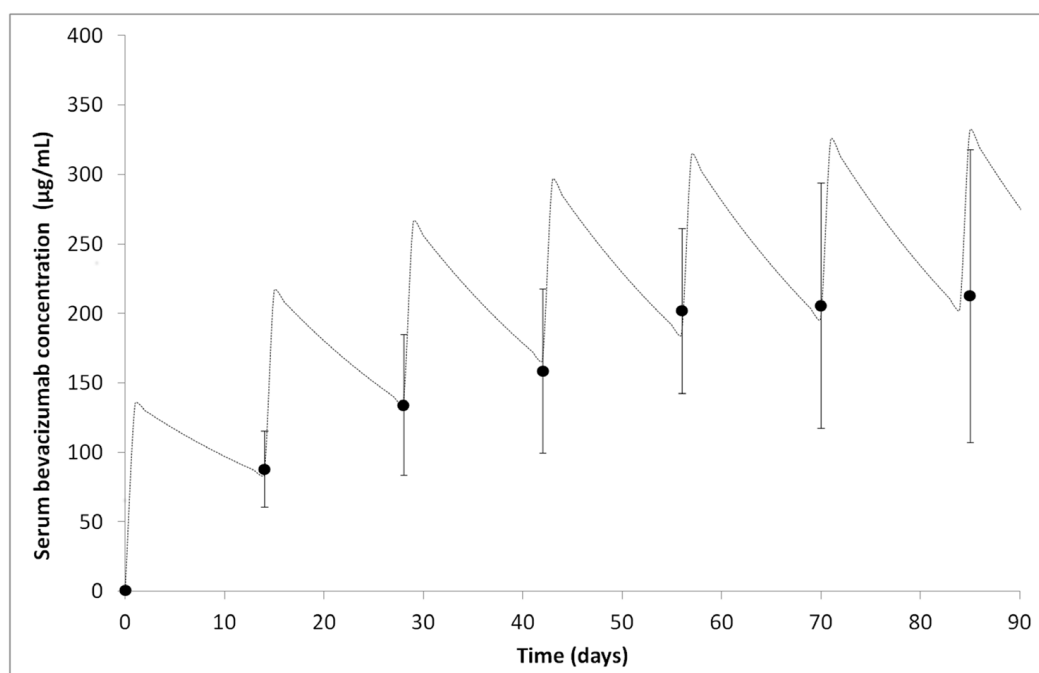


Figure 23 : Evolution of blood bevacizumab concentrations over the first 3 months of treatment. Points represent the mean bevacizumab concentrations for the 17 patients (+/- SD). The dotted line corresponds to the theoretical bevacizumab concentration in a 70-kg patient, with treatment by 7 repeat administrations of 10 mg/kg every other week. The theoretical value was calculated using the bevacizumab half-life reported by Roche-Genentech (20 days).

Beyond the description of inter-individual heterogeneity, our results raise the issue of how PK correlates with clinical outcome. This study thus questions the relevance of an administration protocol for a monoclonal antibody not associated with a companion test to monitor its PK for each patient as part of a personalized therapeutic approach. Our preliminary data strongly suggest that low bevacizumab blood levels (less than 200 mg/L just prior the 6th administration) - associated with residual angiogenesis - could compromise treatment efficacy, whereas a high level (more than 250 mg/L just prior the 6th administration) - close to the toxic dose - could increase the occurrence of side effects (hemorrhage, phlebitis). We observed that the maximum treatment efficacy/side effects ratio appeared with a

bevacizumab concentration between 200 and 250 mg/L. This therapeutic index has to be more precisely determined using a reinforced cohort, Such a deepened study would also refine the pharmacodynamics results, allowing to discriminate patients groups earlier during the treatment. Thus, the serum bevacizumab level is a candidate pharmacodynamic marker for this therapy, and should be further validated to allow tailored treatment schedules to be developed. In contrast with Lu et al.⁹², our data revealed no link between tumor burden and serum clearance. Thus, further studies are required, for example, with blood samples from clinical trial patients.

In line with the well-known relationship between PK parameters and efficacy, our results, and others [8], suggest that bevacizumab concentrations could be a prognostic/response biomarker. Using PK measurements as a companion test for personalizing mAb administration could thus eliminate the current treatment bias. Patients with low levels of circulating bevacizumab could be given an increased drug dose on subsequent administration, while patients with high levels could receive less. The procedure for defining the correction factor to be applied to the doses administered should be determined in future studies using mathematical models, and with data from a larger patient cohort.

There is a huge need for prognostic biomarkers or response indicators when treating patients with bevacizumab. Currently, progression-free survival at 6 months is between 36% and 46% for bevacizumab-treated patients with glioblastoma [9,11], but no benefit in terms of overall survival is observed. Oncologists are thus faced with a situation where they do not know the correct optimum dose for patients. Because of this, mAbs are currently prescribed as a function of maximal therapeutic dose, similar to chemotherapy. Our results suggest that patients could benefit from an early test to adapt the dose, which could improve therapeutic efficacy while decreasing side effects. The clinical endpoints for trials to define doses should move to more functional endpoints, for example considering efficacy. This would shift the focus from a maximum therapeutic dose to an optimal biological dose¹⁰¹.

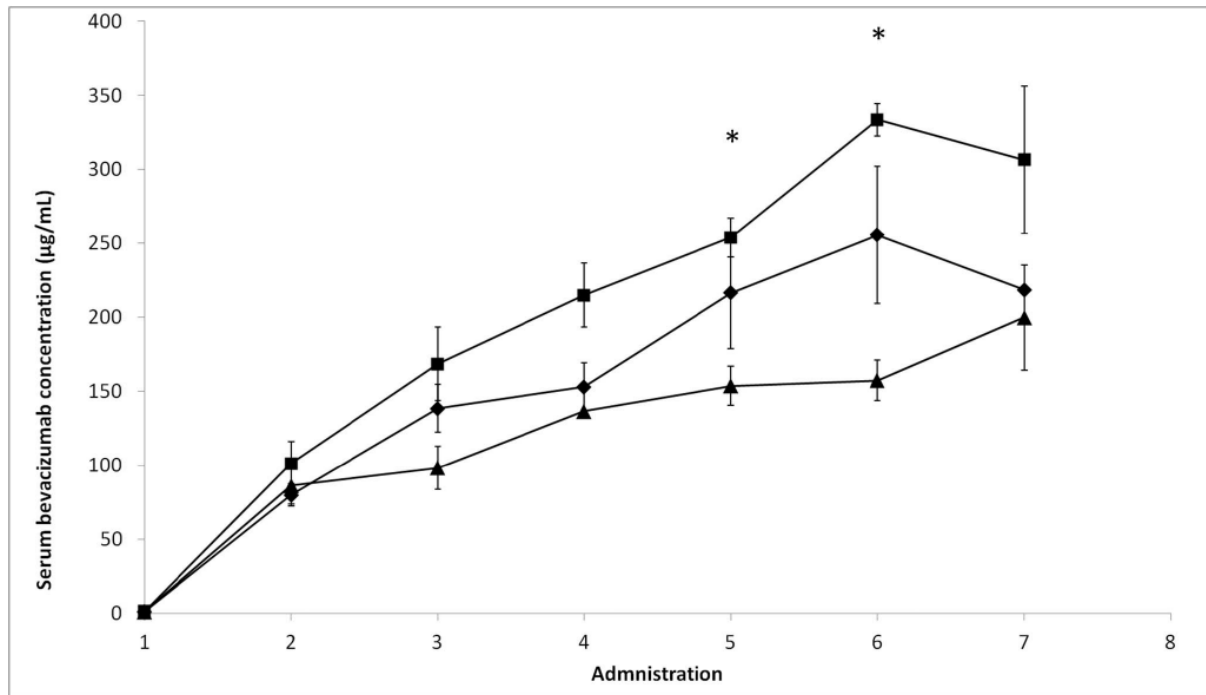


Figure 24 : Serum bevacizumab levels as a function of treatment efficacy. (■) mean value for patients with side effects (n=5); (▲) mean value for patients with residual angiogenesis (n=4); (♦) mean value for patients responding favorably to treatment (n=4).

In conclusion, the fundamental role of bevacizumab in the therapeutic arsenal in oncology, the highly variable patient responses, and the relative lack of data on the PK for this monoclonal antibody suggest that measuring blood bevacizumab levels may be clinically relevant. We have developed a robust and sensitive bevacizumab assay which is rapid and could be suitable for use in clinical routine as part of personalized treatment.

3. Conclusion

Quel que soit le statut biologique des patients, les anticorps thérapeutiques sont presque toujours utilisés en suivant un protocole d'administration standard pour chacun. Mais ce protocole ne prend pas en compte le statut biologique du patient et seul le poids du patient détermine l'administration du bevacizumab.

Nous avons étudié la pertinence de cet unique paramètre dans le protocole d'administration du bevacizumab. Nous avons suivi les concentrations sériques de 17 patients au cours des 3 premiers mois de leur cure de bevacizumab. La concentration moyenne de notre cohorte était proche de la concentration théorique précédemment rapportée avec perfusion intraveineuse toutes les deux semaines à 10 mg / kg de poids corporel. Cependant, malgré le même schéma thérapeutique, nous avons observé une large hétérogénéité des concentrations sériques. Ainsi, à 15 jours après la première administration, les concentrations variaient de 54 à 149 mg/L, et de 73 à 411 mg/L avant la sixième administration. Ces résultats soulignent que les patients traités par l'application du même protocole (10 mg/kg de poids corporel) ne bénéficient pas des mêmes chances d'efficacité du traitement.

Au-delà de la description de l'hétérogénéité inter-individuelle, nos résultats soulèvent la question de la corrélation entre la pharmacocinétique du bevacizumab et de l'évolution clinique. Cette étude s'interroge sur la pertinence d'un protocole d'administration pour un anticorps monoclonal sans qu'il soit associé à un test compagnon pour surveiller sa pharmacocinétique pour chaque patient dans le cadre d'une approche thérapeutique personnalisée. Nos données préliminaires suggèrent fortement que de faibles niveaux sériques de bevacizumab (moins de 200 mg/L, juste avant la 6e administration) - associées à une angiogenèse résiduelle - pourraient compromettre l'efficacité du traitement, alors qu'un niveau élevé (plus de 250 mg/L, juste avant la 6e administration) - proche de la dose toxique ? - pourraient favoriser la survenue d'effets secondaires (hémorragies, phlébite). Nous avons observé que le rapport maximum des effets de l'efficacité du traitement / secondaires est apparue avec une concentration bevacizumab entre 200 et 250 mg/L. Cet indice thérapeutique doit être plus précisément déterminé en élargissant la cohorte. Une telle étude approfondie permettrait également d'affiner les résultats pharmacodynamiques, en distinguant les groupes de patients pour lesquels le traitement est efficace de façon plus précoce. Le niveau de bevacizumab sérique peut donc être considéré comme un marqueur pharmacodynamique candidat pour ce traitement, devant être validé pour permettre la mise

en place de thérapeutiques adaptées. En contraste avec Lu et al. (Lu et al., 2008), nos données n'ont révélé aucun lien entre la charge tumorale et la clairance sérique. D'autres études sont donc nécessaires, par exemple, avec des échantillons de sang de patients de l'essai clinique.

En lien avec la relation entre les paramètres pharmacocinétiques et l'efficacité, les résultats de cette étude et les données publiées ²⁷ suggèrent que les concentrations bevacizumab pourrait être un pronostic/ biomarqueur de réponse. Utilisant des mesures de PK comme un test compagnon pour personnaliser l'administration de mAb pourrait éliminer le biais de traitement actuel. Les patients avec de faibles niveaux de bevacizumab circulant pourraient recevoir une dose plus élevée de médicament à l'administration ultérieure, alors que les patients avec des niveaux élevés pourraient en recevoir moins. La procédure pour définir le facteur de correction à appliquer aux doses administrées doit être déterminée dans des études futures en utilisant des modèles mathématiques, portant sur une cohorte de patients plus importante.

Jusqu'à présent, dans la mise en place d'un traitement par bevacizumab, aucun biomarqueur pronostic ou prédictif lors du traitement de patients n'est clairement identifié. De ce fait, la survie sans progression à 6 mois est compris entre 36% et 46% pour les patients traités par bevacizumab glioblastome ^{88,94}, mais aucun avantage en termes de survie globale n'est observé ⁵⁹. En fait, les oncologues sont confrontés à une situation où ils ne connaissent pas la dose optimale correcte pour les patients. Pour cette raison, les anticorps monoclonaux sont prescrits en fonction de la dose thérapeutique maximale, similaire à la chimiothérapie. Nos résultats suggèrent que les patients pourraient bénéficier d'un test de détection précoce permettant d'adapter la dose, ce qui pourrait améliorer l'efficacité thérapeutique tout en diminuant les effets secondaires. Dans la définition des critères à établir pour définir les doses, l'approche doit s'orienter vers une limitation plus fonctionnelle, tenant compte de l'efficacité. Il s'agit de réorienter le concept de dose thérapeutique maximale vers une notion de dose biologique optimale ¹⁰¹.

En conclusion, le rôle fondamental du bevacizumab dans l'arsenal thérapeutique en oncologie, les réponses très variables des patients, et l'absence relative de données sur la pharmacocinétique de cet anticorps monoclonal, suggèrent que la mesure des niveaux de bevacizumab dans le sang peut être cliniquement pertinente. Nous avons développé un test bevacizumab robuste et sensible qui est rapide et pourrait être adapté pour une utilisation en routine clinique dans le cadre d'un traitement personnalisé.

PARTIE 2 :

Délivrance localisée dans le traitement
des GBM

PARTIE 2 : Délivrance localisée dans le traitement des GBM

La grande spécificité du tissu cérébrale nécessite une protection accrue de son environnement. Celle-ci est réalisée par la barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHE joue un rôle de filtre en étant perméable aux nutriments essentiels à la fonction cérébrale, en régulant le passage des ions, et imperméabilité aux substances neurotoxiques. De ce fait, la BHE bloque également les molécules thérapeutiques, limitant l'efficacité de molécule thérapeutique des maladies cérébrales.

La faible perméabilité des molécules thérapeutiques à travers la BHE participe à l'échec thérapeutique dans les pathologies cérébrales ¹⁰². Cela rend nécessaire l'utilisation de concentrations élevées de molécules thérapeutique dans le sang afin d'obtenir une dose biologique dans le cerveau. Cette concentration sanguine expose potentiellement les patients à des effets indésirables graves et fréquents. De nombreuses stratégies ont été testées pour augmenter la biodistribution de molécules thérapeutique dans le tissu cérébrale, du fait du manque de perméabilité de la BHE pour favoriser une efficacité de la chimiothérapie ¹⁰³. Pour contourner la BHE, l'injection directe d'agents thérapeutiques est proposée dans le traitement de certaines maladies cérébrales comme les tumeurs cérébrales. La CED (*convection-enhanced delivery*) est une technique d'injection sous pression continue d'un fluide contenant un agent thérapeutique. Cette technique a été proposée et présentée par des chercheurs de l'*US National Institutes of Health* (NIH) au début des années 1990 pour injecter des médicaments perméable à la BHE ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

L'échappement thérapeutique est quasi systématique dans le traitement des GBM. On se voit donc contraint de se tourner vers des nouvelles molécules prometteuses dont leur action est limitée par la BHE, comme le bevacizumab. Or le surdosage de bevacizumab sanguin pourrait favoriser l'apparition d'effets secondaires graves ^{27,107}. Il est donc nécessaire d'adapter l'administration de bevacizumab dans le cas des tumeurs cérébrale afin de limiter la biodistribution de l'anticorps en dehors de la zone d'intérêt. A côtés des voies d'administration dites « classiques » (perfusion intraveineuse, *per os*..) il devient intéressant d'envisager une méthode lourde d'administration, apportant à la tumeur le maximum de principe actifs sans atteindre des niveaux circulants favorisant des effets secondaires irréversibles.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle de GBM chez la souris. Après une imagerie de contrôle, nous avons comparé l'efficacité de deux modes d'administration de bevacizumab chez la souris, une administration intrapéritonéale (IP) et une CED.

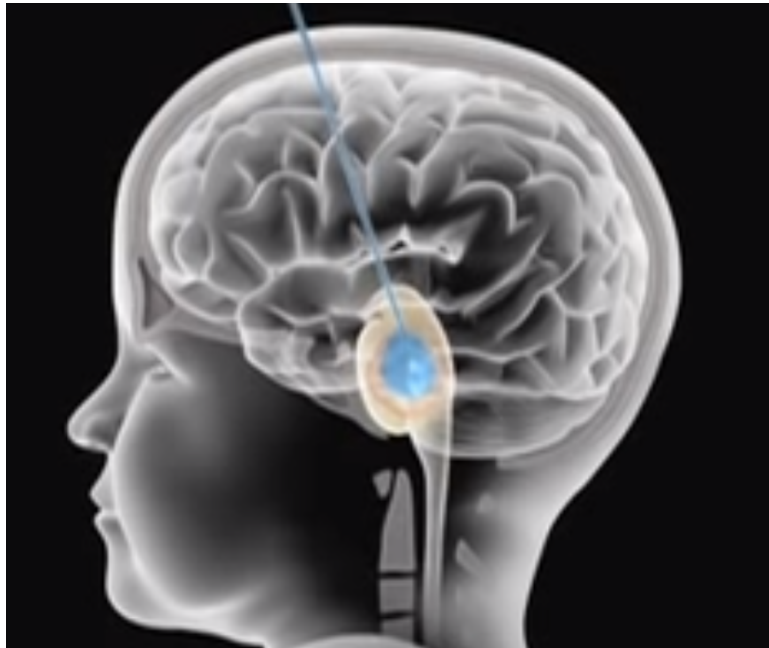


Figure 25 : Injection intratumorale de drogue sur le principe de la CED

1. Matériels et méthode

1.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire U87 a été cultivée dans du milieu DMEM supplémenté de 10% de SVF, 2 mmol/L de L-glutamine, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 40 µg/ml de gentamycine. Avant l'implantation, les cellules sont resuspendues avec 0,05% de solution de trypsine/EDTA, et le culot est repris dans du milieu DMEM seul avec une concentration finale de $5 \cdot 10^6$ cellules/5 µl.

1.2. Modèle de xénogreffe murin

Les souris *nude* proviennent de chez Harlan (France). À six semaines et 20g, les animaux sont anesthésiés (Isofluran, 1,5L/min) et placés sur un cadre de stéréotaxie afin de permettre l'implantation intracérébrale. Une seringue Hamilton est utilisée pour injecter 5 µl de cellules à 10^6 cellules/µl dans le striatum droit, soit 2 mm à droite du bregma, et 2,5 mm de profondeur, à un débit de 1 µl/min.

1.3. IRM de contrôle

Les différentes séquences sont réalisées (T1, T2 et T1 après injection de gadolinium) dans le but de détecter tout saignement après l'implantation de la xénogreffe ou lors de l'injection du traitement, tout œdème et l'absorption de gadolinium pour contrôler la néo-vascularisation et la réponse au traitement.

Les scans ont eu lieu au jour 14 pour évaluer la croissance tumorale après l'implantation et pour former des groupes homogènes en terme de volume tumoral pré-thérapeutique et au jour 28 pour évaluer la réponse tumorale à celui du traitement et pour détecter les effets secondaires potentiels du protocole de traitement.

1.4. Traitement

Les animaux sont divisés en trois groupes. Le premier groupe reçoit une mono-dose de 10 mg/kg de bevacizumab (200µg/150µl) par voie intrapéritonéale (IP). Le second groupe est traité par une administration stéréostatique intratumorale d'une mono-dose de bevacizumab à 3 mg/kg (60µg/10µl) par CED à un débit de 1µl/min. Enfin, un troisième groupe est traité par administration stéréostatique intratumorale d'une mono-dose de bevacizumab inactivé à 3 mg/kg (60µg) par CED (CONTROL).

1.5. Dosage de bevacizumab

Vingt heures après l'administration du bevacizumab, les animaux sont euthanasiés et les organes sont prélevés et stockés à -80°C. Le bevacizumab a été dosé par la technique *suspension array*¹⁰⁷. En bref, le VEGF est couplé à des billes magnétiques et déposés par puits dans des plaques à fond plat. Les billes sont incubées avec l'échantillon dilué de façon appropriée dans du PBS. Puis les billes sont incubées avec un anticorps anti-IgG humaine couplé à la phycoérythrine (PE) (Sigma- Aldrich). La liaison PE a été mesurée sur un BioPlex 220 (Bio-Rad) et analysées en utilisant le logiciel BioPlex Manager 5.0 (Bio-Rad).

1.6. Immuno-histofluorescence

Les coupes cryogéniques ont été traitées pour l'immunohistochimie avec un tampon de blocage (PBS contenant du sérum de chèvre à 10%) pendant 30 min et ensuite incubées avec les anticorps primaires, de lapin au type de souris collagène IV (dilution 1:1000, Novotec 20451), Ki67 anticorps monoclonal de souris (dilution 1:100, clone MIB1, M7240, Dako) ou monoclonal de souris anti CD133, une nuit à 4°C dans une chambre froide. Une deuxième incubation a été réalisée avec des anticorps secondaires, respectivement, de chèvre anti-lapin Couplé Cy3 et FITC anti souris.

2. Résultats

2.1. Dosage du bevacizumab

Le bevacizumab a été administré par voie IP à 10 mg/kg (200µg) ou par CED à 3 mg/kg (60µg). Le dosage du bevacizumab est réalisé 20h après le traitement dans le sang (IP=125,6+/-22,8 µg/ml; CED=1,8+/-1,6 µg/ml), Le cerveau (IP=0,146+/-0,051 µg/ml; CED=0,163+/-0,074 µg/ml) dans la tumeur (IP=0,307+/-0,127 µg/ml; CED=0,114+/-0,040 µg/ml), dans le foie (IP=1,314+/-0,636 µg/ml; CED=0,025+/-0,029 µg/ml) et dans les reins (IP=5,554+/-2,416 µg/ml; CED=0,091+/-0,102 µg/ml).

Dans le sang, la concentration en bevacizumab représente 63% de la dose injectée en IP alors que lors d'une administration en CED on en détecte seulement 3%. Dans le cerveau, seulement 0,27% du bevacizumab administré en IP est détecté contre 0,51% en CED. Dans la tumeur, on retrouve 0,15% de bevacizumab injecté en IP contre 0,19% en CED.

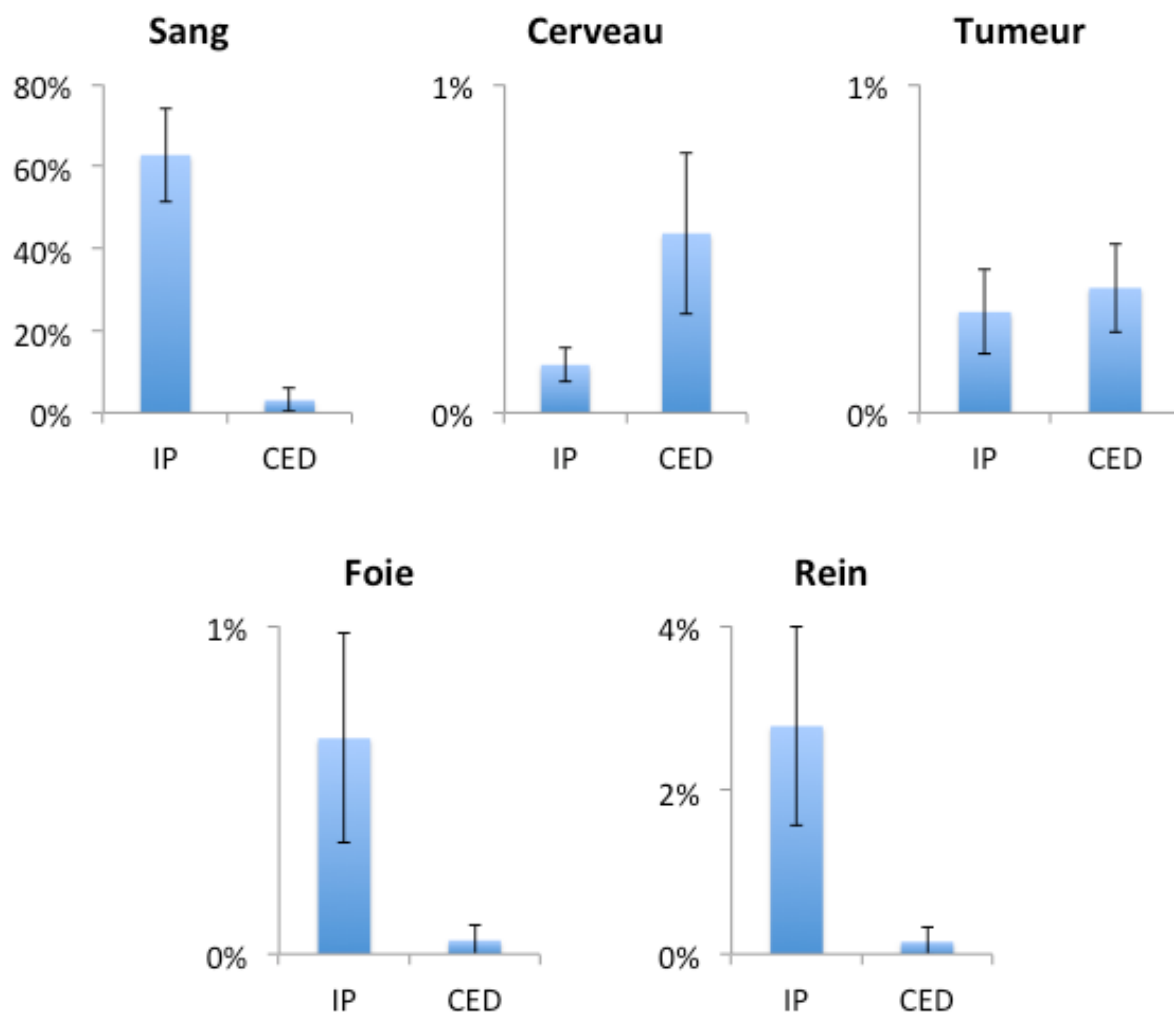


Figure 26 : Concentration locale de bevacizumab dans les le foie, le rein, le sang, le cerveau et la tumeur cérébrale de la souris en fonction de la dose injectée par une administration IP de 200µg ou CED de 60µg (test de logrank, $p < 0,02$).

2.2. Survie des animaux

Les médianes de survies dans les différents groupes ($n = 10$ par groupe) ont été de 24 jours dans le groupe contrôle, 27 jours dans le groupe IP et 38 jours dans le protocole CED (test de *logrank*, $p < 0,02$). Les survies maximales ont été de 43 jours pour le groupe contrôle, 45 jours pour le groupe IP, et 162 jours pour le groupe CED.

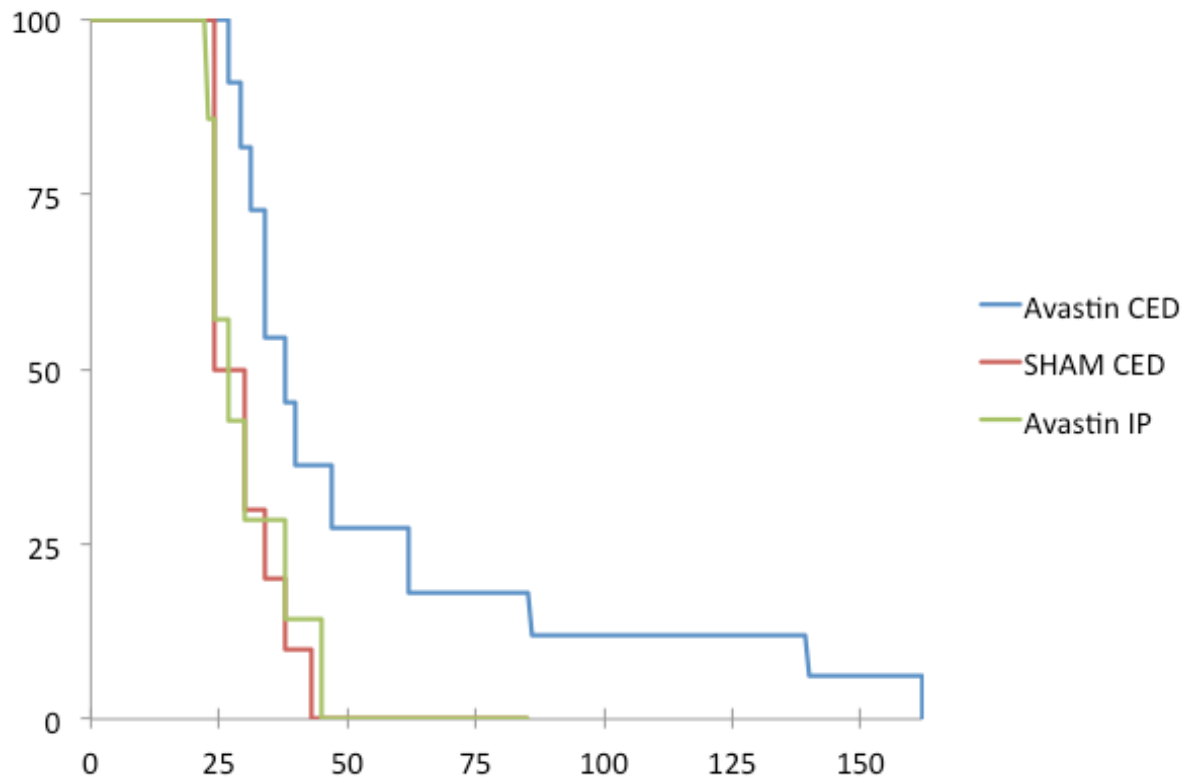


Figure 27 : Courbe de Kaplan-Meier de la survie de souris nude avec tumeur intracérébrale et traitement de bevacizumab par IP (200µg), CED (60µg) et contrôle par CED (SHAM).

2.3. Immuno-histofluorescence

Différents examens d'immunohistochimie et immunofluorescence ont été réalisées. Le marquage CD133 évalue la prolifération de la néo-angiogenèse vasculaire. Le marquage du collagène IV met en évidence la vasculaire. La prolifération tumorale est estimée en testant Ki67. Le traitement au bevacizumab par CED met en évidence une diminution de la néo-vascularisation, de la vascularisation mais également de la prolifération tumorale (figure 24).

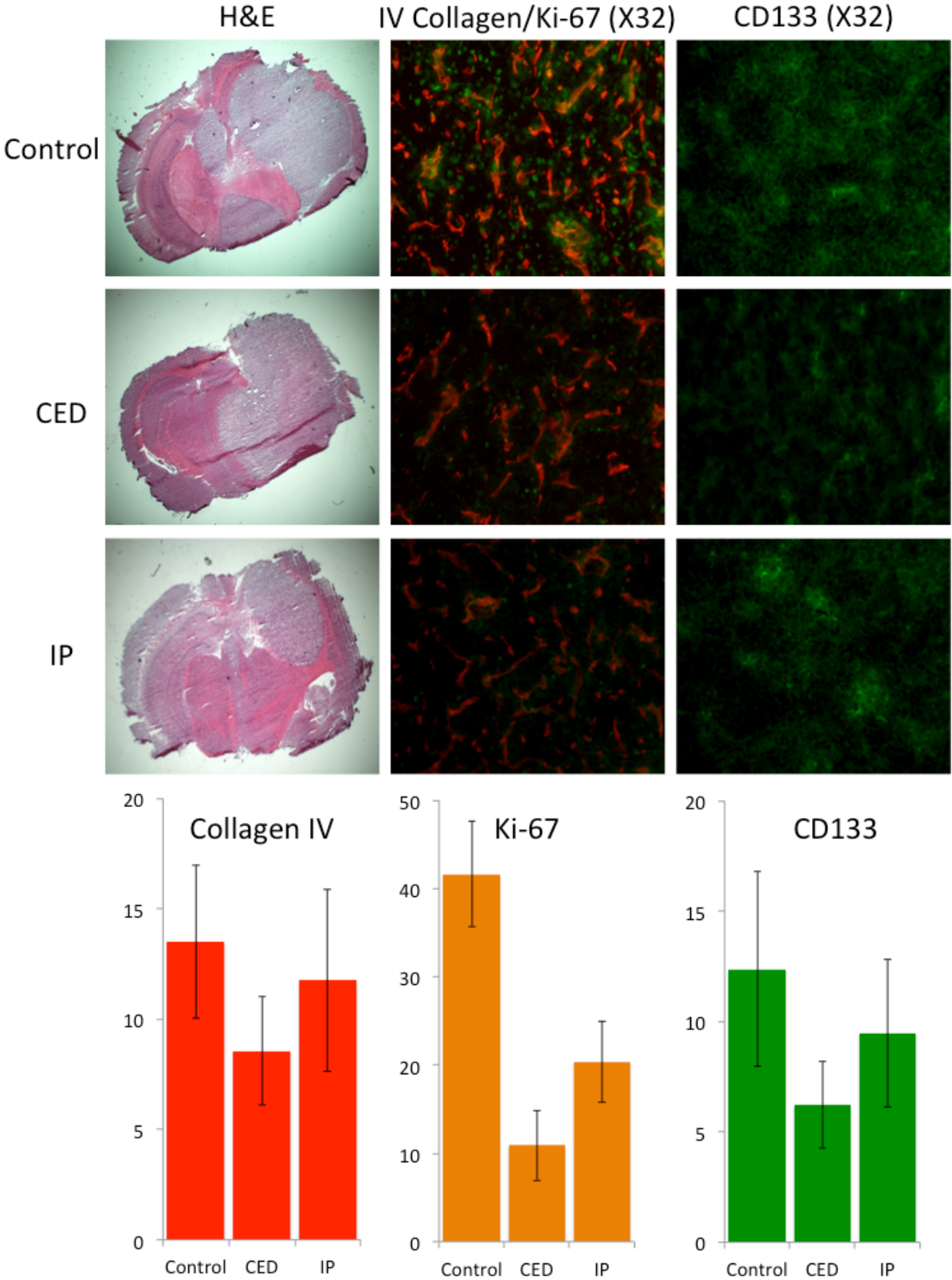


Figure 28 : Immunohistochime de coupe cerveau de souris avec une tumeur intracérébrale et traitement bevacizumab par IP, CED et contrôle CED.

3. Discussion

Les tumeurs du SNC restent un défi en matière de gestion, en particulier les GBM où aucun traitement actuellement disponible n'est réellement efficace. Parallèlement à la recherche d'un traitement révolutionnaire pour le traitement des tumeurs du système nerveux central, il est nécessaire d'améliorer l'administration des médicaments actuellement disponibles. L'utilisation du bevacizumab dans le traitement des glioblastomes est largement discutée. L'apparition d'effets secondaires importants met en avant la balance bénéfico-risque qui n'est pas systématiquement en faveur du patient^{27,108,109}. Sans aucun doute, le bevacizumab a eu un bénéfice clinique remarquable en retrait de tumeur cérébrale et une augmentation de la survie sans progression à 6 mois. Cependant, la thérapie anti-VEGF n'est pas curative, la survie globale reste inchangée⁵⁹.

Comme étudié ici, les anticorps monoclonaux souffrent encore du passage au travers de la BHE¹¹⁰. Plusieurs approches sont explorées pour améliorer la diffusion de molécules thérapeutiques au travers de la BHE¹⁰². La présence de la BHE est une limitation sévère dans le traitement de pathologies cérébrales comme le GBM. La CED²⁸, technique d'administration localisée dans le lit de la tumeur augmenterait l'efficacité anti-tumorale des drogues en améliorant la bio-distribution localisée, et en limitant les effets secondaires généraux.

Des essais chez la souris montrent une amélioration de l'efficacité du bevacizumab par une administration CED. En effet, chez la souris, on constate une efficacité significativement accrue du bevacizumab lors d'une administration CED contre une administration IP. La médiane de survie est respectivement de 38 et 28 jours (test de *logrank*, $p < 0,02$). Cette amélioration de l'efficacité est d'autant plus probante, que la dose injectée est 3 fois moins importante en CED (60µg contre 200µg).

La récurrence des GBM est quasiment systématique et est due aux cellules infiltrantes qui envahissent le parenchyme cérébral. Alors que la BHE peut être dégradée au niveau de la tumeur, les thérapies conventionnelles n'atteignent jamais le tissu tumoral infiltrant. Le dosage du bevacizumab en contralatéral de la tumeur, met en évidence une diffusion de l'anticorps au travers le parenchyme cérébral dans une administration CED. Cette spécificité dans ce type d'administration permet un ciblage local mais également d'atteindre les cellules infiltrantes.

PARTIE 2 : Délivrance localisée dans le traitement des GBM

Une administration CED permet de réduire la dose thérapeutique efficace et limite ainsi les concentrations circulantes importantes. Le bevacizumab présente des risques d'effets secondaires importants qui pourraient être liés à des concentrations sanguines importantes.

PARTIE 3 :
Le turnover des protéines

Récemment, des progrès ont été réalisés dans l'identification du profil génétique des glioblastomes. Le *Cancer Genome Atlas* (TCGA) et d'autres groupes ont créé un profil génétique complet des glioblastomes, révélant de nombreuses mutations jouant un rôle important dans la maladie. Un grand nombre de protéines sont produites à partir ces gènes impliqués dans la pathogenèse des GBM^{111-113,114} et pourraient devenir des indicateurs de la pathologie. Ces marqueurs biologiques ont le potentiel d'être utilisés en conjonction avec les données cliniques afin d'affiner le diagnostic et *in fine* le traitement. Cependant, leur utilisation est brièvement limitée par le caractère invasif nécessaire à l'analyse (biopsie) mais également par l'impossibilité fréquente d'établir une corrélation entre les concentrations de transcrits et de protéines¹⁵.

Il est donc nécessaire de découvrir des biomarqueurs périphériques. Une voie de recherche est de considérer la concentration apparente du marqueur biologique non pas comme un état à un instant donné mais bien comme un équilibre dynamique, c'est à dire accéder au *turnover* des protéines. Une étude du *turnover* des protéines tumorales permettrait la mise en évidence de variations fonctionnelles impliquées dans la pathologie. On peut supposer que l'apparition puis le développement de pathologies, comme une tumeur, sont associés à une dynamique spécifique de certaines protéines impliquées dans le processus de cancérisation, comme on peut l'observer dans le transcriptome¹¹⁵. L'étude du *turnover* des protéines peut donc mettre en évidence des biomarqueurs et des voies de signalisations clés dans la cancérogenèse et la réponse thérapeutique.

Le suivi du *turnover* protéique ne peut être réalisé qu'à l'aide d'un marquage des protéines en temps réel facilement identifiable. Afin d'être le plus proche possible de la structure native de la protéine d'intérêt, il est nécessaire de réaliser un marquage « transparent » pour la structure et la fonctionnalité de la protéine. Un marquage isotopique stable sur un acide aminé couplé à une analyse protéomique par spectrométrie de masse permet de suivre ce marquage. Cette approche a été utilisée pour des expériences *in vitro* mais également *in vivo* chez plusieurs animaux, notamment la souris et le poulet^{17,18,116}. Cette stratégie de marquage isotopique, permet dans un premier temps l'étude du turnover de protéines. L'étude de Price mesure les turnover de protéine cérébrale chez la souris. Pour cela, ils ont alimenté les animaux avec des algues enrichies en azote 15, ils ont ensuite analysé les échantillons de cerveau par gel SDS PAGE 1D puis par LC-MS/MS. Ils ont ainsi mesurer le turnover de 1100 protéines cérébrales¹¹⁶. Une autre équipe a réalisé un marquage à l'aide de la ¹³C₆-Leucine chez l'homme par voie intraveineuse associé à une alimentation pauvre

en leucine. Ils ont alors suivi une protéine unique, la bêta-amyloïde, par immunoprécipitation et une LC-MS/MS (*electrospray*)¹⁹. L'analyse des *turnover* permettra, dans un second temps, de mettre en évidence des candidats biomarqueurs.

Ce travail porte sur l'étude de la dynamique des protéines tumorales par une technique de marquage isotopique stable *in vivo*. Au travers de cette étude, les variations de la dynamique protéique dans le phénomène de cancérisation seront étudiées. Ces modifications seront recherchées dans un premier temps au niveau tissulaire puis au niveau périphérique par l'étude du sécrétome tumoral. Il sera ainsi possible de compléter l'identification génomique et transcriptomique par une identification protéomique de la pathologie et de mettre en évidence des biomarqueurs périphériques.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Etude préclinique

Les souris *nude* (Harlan) ont été nourries avec une alimentation synthétique sans valine (Harlan) (figure 28) et reçoivent une injection intrapéritonéale de 2,5 mg/jour de ¹³C₅-¹⁵N-Valine (EURISOTOP, Saclay) dilué dans NaCl 0,9% pendant une période de 40 jours en continu.

Formula	g/Kg
L-Alanine	3.5
L-Arginine HCl	12.1
L-Asparagine	6.0
L-Aspartic Acid	3.5
L-Cystine	3.5
L-Glutamic Acid	40.0
Glycine	23.3
L-Histidine HCl, monohydrate	4.5
L-Isoleucine	8.2
L-Leucine	11.1
L-Lysine HCl	18.0
L-Methionine	8.2
L-Phenylalanine	7.5
L-Proline	3.5
L-Serine	3.5
L-Threonine	8.2
L-Tryptophan	1.8
L-Tyrosine	5.0
Sucrose	351.68
Corn Starch	150.0
Maltodextrin	150.0
Soybean Oil	80.0
Cellulose	30.0
Mineral Mix, AIN-93M-MX (94049)	35.0
Calcium Phosphate, monobasic, monohydrate	8.2
Vitamin Mix, AIN-93-VX (94047)	13.0
Choline Bitartrate	2.5
TBHQ, antioxidant	0.02

Figure 29 : Composition de l'alimentation sans valine des souris.

1.2. Préparation des échantillons

Les échantillons sont prélevés lors de l'euthanasie de l'animal et conservés au -80°C. Les tissus sont lysés dans le tampon RIPA (25mM Tris-HCl (pH 7.6), 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), puis centrifugé pour récupérer les protéines solubles. Les échantillons sont dosés par la technique de QUBIT® (Life Technologies). La digestion est réalisée avec le mix endolysC/trypsine (Promega) en gel à 37°C overnight.

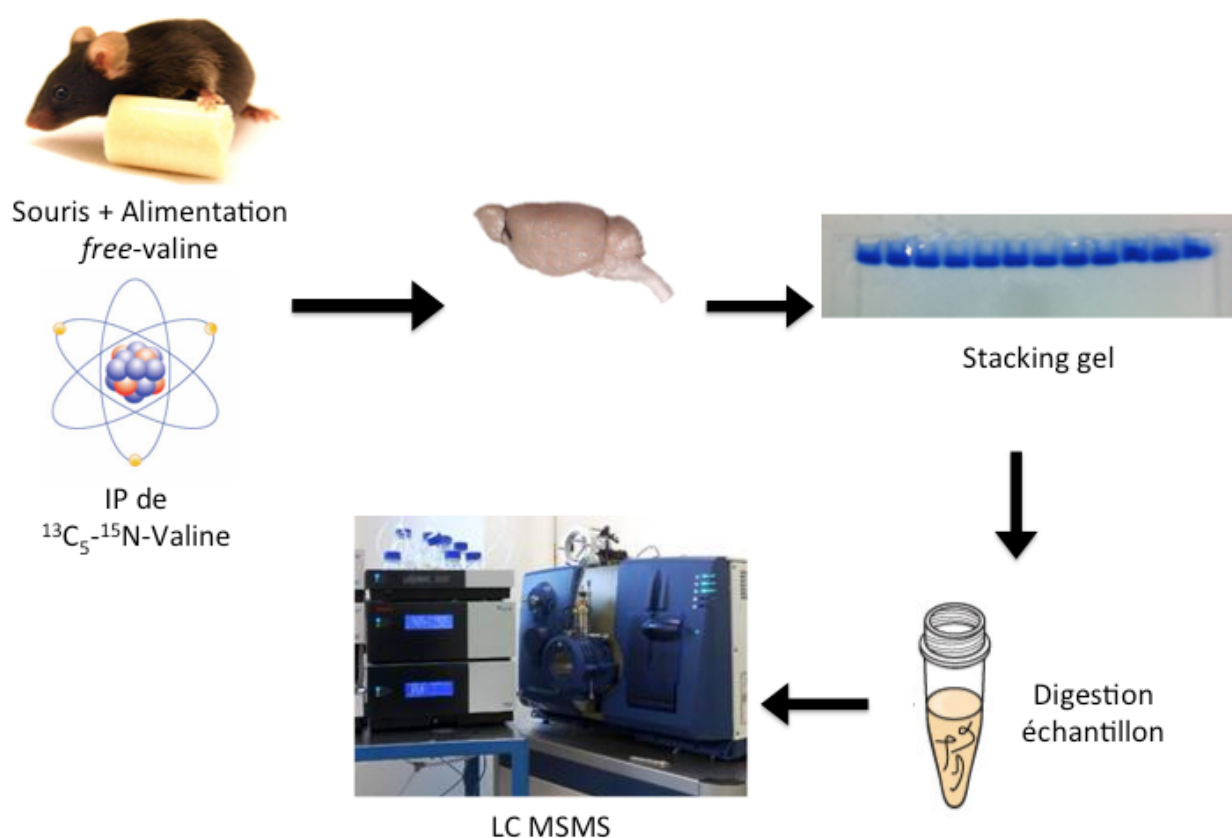


Figure 30 : Protocole expérimental. Les animaux sont alimentés avec des nutriments free valine et injecté quotidiennement de $^{13}\text{C}_5$ - ^{15}N -Valine en IP. Les tissus ont été homogénéisés, puis analysés dans un gel 1D SDS/PAGE. Digestion in-gel libèrent des peptides à partir du gel, qui sont ensuite analysés par LC-MS/MS en mode SRM. Pour déterminer le turnover, les peptides marqués sont comparés à leurs analogues non marqués.

1.3. LC-MS/MS et bioinformatique

Afin de construire les méthodes d'analyse LC-SRM, une identification des protéines présentes dans le tissu cérébral de souris est réalisée sur LC (Ultima 3000, Dionex) MS/MS (Orbitrap Velos, Thermo). Les spectres obtenus sont analysés avec le logiciel Mascot.

La construction des méthodes d'analyse LC-SRM est alors construite en sélectionnant les protéines identifiées avec les meilleurs scores. On sélectionne alors les peptides signatures à mono et di-valine et on réalise un BLAST pour ne conserver que les peptides spécifiques. Typiquement, quelques peptides représentatifs permettent une confirmation de la présence de la protéine et à en déterminer la quantité ¹¹⁷. Les transitions sont déterminées avec le logiciel Skyline® (MacCoss Lab Software).

2. Résultats

2.1. Etude préliminaire

2.1.1. Alimentation

Un problème se pose immédiatement lors du marquage isotopique. On retrouve systématiquement l'acide aminé choisi sous forme non marquée dans l'alimentation. Cet acide aminé entre alors en compétition et limite le taux de marquage. Il est nécessaire dans un premier temps de vérifier la nécessité ou non d'adapter une alimentation spécifique (pauvre en acide aminé non marqué choisi). Pour cela, on compare le taux de marquage en valine ou en lysine de deux groupes de souris. Un premier groupe est nourri avec une alimentation « normale » et une dose de 2,5 mg/jour de ¹³C₅-¹⁵N-Valine est injectée par voie IP pendant 20 jours. Pour le second groupe, une alimentation déplétée en lysine est utilisée pour nourrir les animaux, supplémentée par une administration quotidienne de 2,5 mg de ¹³C₆-lysine.

En réalisant un marquage par une administration intrapéritonéale quotidienne de 2,5 mg de ¹³C₅-¹⁵N-Valine associé à une alimentation normale, on obtient un marquage de seulement 2% des valines des peptides analysés au bout de 20 jours de marquage. Si l'on marque les protéines par une administration intrapéritonéale quotidienne de 2,5 mg de ¹³C₆-Lysine

associé à une alimentation *free-lysine*, on mesure un marquage de 18% des lysines des peptides analysés (figure 31). Bien que l'analyse n'ait pas porté sur les mêmes acides aminés, les deux acides aminés ont une représentation similaire dans les protéines. De plus, ils appartiennent à la classe des acides aminés essentiels. L'alimentation contrôlée permet une augmentation du marquage du protéome *via* un acide aminé.

On peut noter une adaptation difficile des animaux pour l'alimentation *free-valine* qui semble manquer d'appétence chez les animaux de 6 semaines. Cependant, les animaux de 8 semaines n'ont pas eu de problème pour changer de régime alimentaire.

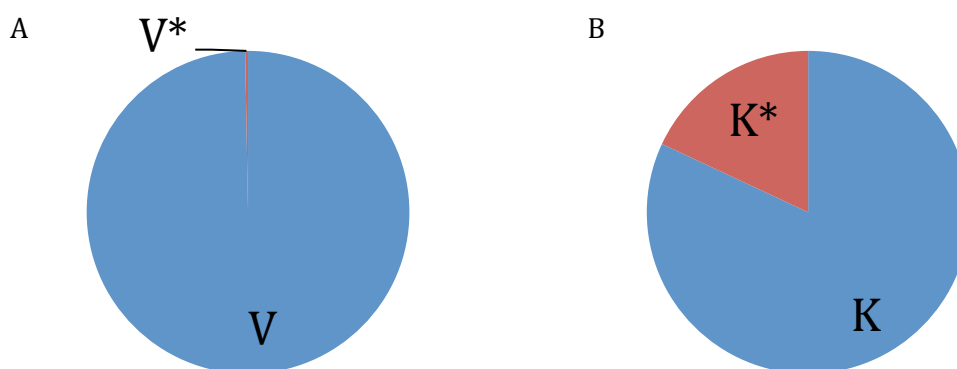


Figure 31 : Comparaison du taux de peptides tryptique marqués et non marqués du plasma de souris analysés par LC-MS/MS (orbitrap) Taux de marquage isotopique chez la souris. A. Souris nourries avec une alimentation non déplétée et marquée à la $^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ Valine pendant 20 jours. B. Souris nourries avec une alimentation *free-lysine* et marquée à la $^{13}\text{C}_6$ -lysine pendant 20 jours.

2.1.2. Choix de l'acide aminé

On a vu précédemment (*cf* introduction 3.5), le calcul du *turnover* nécessite au préalable de définir le RIA_{∞} . Pour définir le RIA_{∞} , il est nécessaire de suivre le marquage isotopique de peptides avec deux positions de marquages. Dans un second temps, la mesure du *turnover* se réalise sur des peptides ayant une unique position de marquage à partir des données de RIA_{∞} . Afin d'obtenir une large gamme de peptides répondant à nos contraintes, il est nécessaire de sélectionner un acide aminé donnant la possibilité d'obtenir le maximum de peptides à une et à deux positions de marquage.

PARTIE 3 : Le turnover des protéines

Afin de limiter tout contaminant, le marquage doit être effectué à partir d'un acide aminé essentiel (tableau 8). De par leur structure simple, quatre des huit acides aminés essentiels présentent un intérêt pour l'étude :

- Lysine
- Leucine
- Isoleucine
- Valine

La lysine est utilisée dans la technique de SILAC ¹⁶. La digestion trypsique est traditionnellement utilisée et maîtrisée dans l'analyse protéomique. La trypsine clive les protéines après chaque lysine et arginine. Il n'est donc théoriquement pas possible d'obtenir des peptides avec une double position de marquage.

Tableau 13 : Etudes réalisées avec un marquage isotopique à la leucine.

Equipe	Marquage
Lichtenstein et al. 17118	² H ₃ -Leucine, ² H ₃ -Valine, ¹³ C ₂ -Lysine
Bateman RJ et al. 1819	¹³ C ₆ -Leucine
Steiner SJ et al. 18119	d5-Phenylalanine + ¹³ C-Leucine
Van Den Akker CH et al. 19120	¹³ C- ¹⁵ N-Leucine, ¹³ C ₅ -Valine, ¹³ C-Methionine

La leucine marquée est utilisée dans un grand nombre d'essai clinique ^{19,118-120} (tableau 13). Ceci peut s'expliquer par sa forte occurrence dans les protéines humaines. La leucine représente plus de 9% des acides aminés des protéines humaines. L'isoleucine représente elle, 5% des acides aminés que composent les protéines humaine. Mais l'isoleucine et la leucine possèdent la même formule brute C₆H₁₃NO₂ et donc la même masse de 131 g/mol (tableau 14). La spectrométrie de masse discrimine les acides aminés en fonction de leur m/z et ces deux acides aminés possèdent les mêmes propriétés. Dans une démarche de

découverte, l'identification exacte des peptides peut-être donc sujette à confusion avec des deux acides aminés.

Tableau 14 : Caractéristiques d'acides aminés essentiels

Acide aminé	formule brute	masse molaire	Occurrence
Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131 g/mol	9,1 %
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131 g/mol	5,3 %
valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117 g/mol	6,6 %

La valine est le second acide aminé essentiel le plus abondant dans les protéines humaine (>6%). La valine est un acide aminé aliphatique (tout comme la leucine et l'isoleucine). Ainsi sa structure simple et sa masse molaire spécifique en font un bon candidat pour la marquage *in vivo*.

2.1.3. Test de toxicité

Une étude de toxicité a été menée chez 10 animaux avec administration chronique de ¹³C₅-¹⁵N-Valine pendant 40 jours à raison de 200 mg/kg/jour (valeurs recommandée par jour : 10-19 mg/kg ¹²¹) par voie intrapéritonéale avec une alimentation normale.

Aucun animal n'a présenté de signe d'intolérance durant les 40 jours. La ¹³C₅-¹⁵N-Valine ne semble pas présenter de toxicité anormale chez l'animal lors d'une dose réitérée de 5 mg/jour.

2.2. Cinétique d'incorporation

Les animaux ont été alimentés pendant 40 jours avec une alimentation free-valine. Une administration quotidienne de 2,5 mg de ¹³C₅-¹⁵N-Valine est réalisée par voie intrapéritonéale. Afin de réaliser notre étude, un animal est euthanasié à différents points de cinétique (J0, J10, J20, J30, J40) et ses organes sont prélevés et stockés à -80°C. Le suivi de l'incorporation isotopique est ainsi réalisé en SRM sur les peptides signatures à valine

(Figure 30). On constate une accumulation du peptide portant une $^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ -Valine dès 10 jours. Le marquage s'intensifie progressivement au court du temps et du marquage.

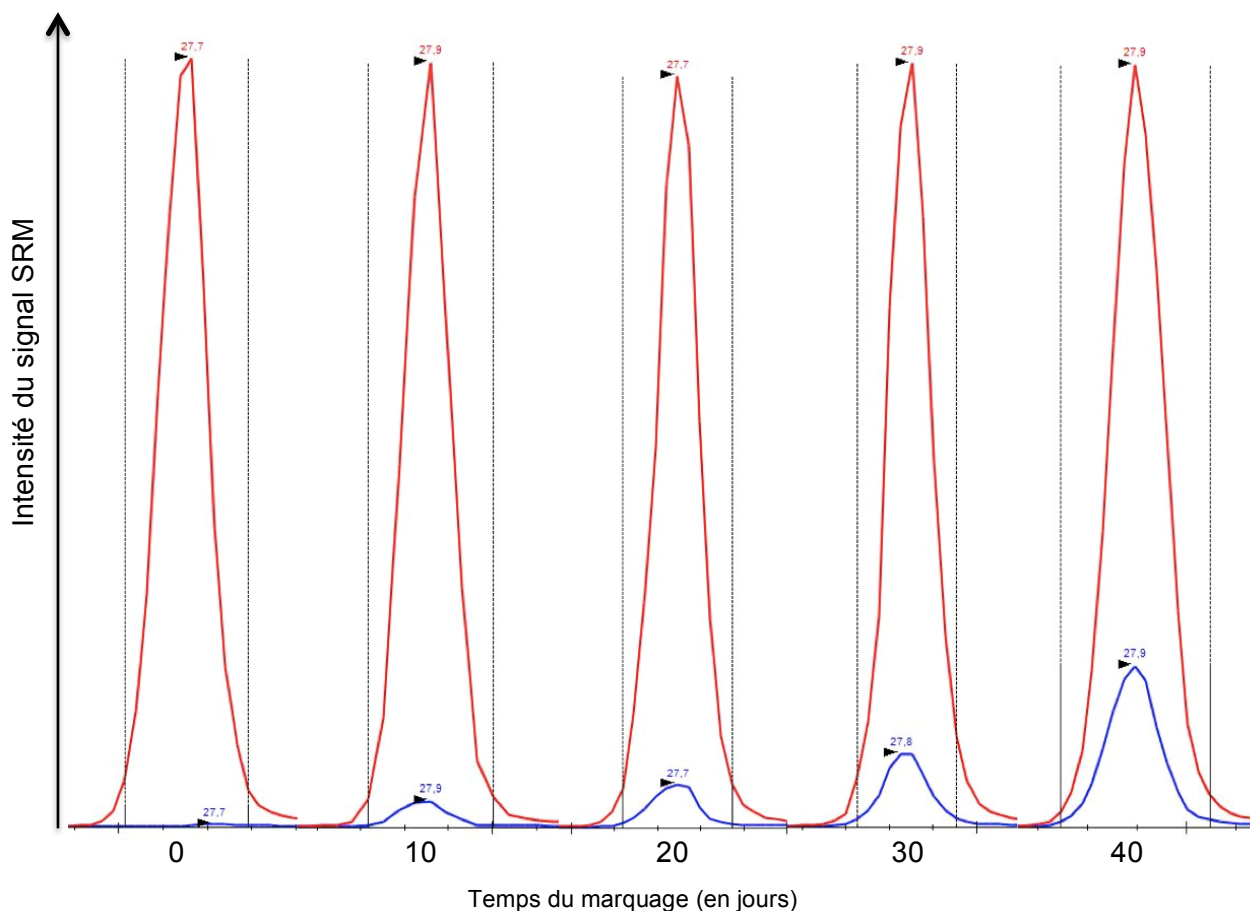


Figure 32 : Suivi d'incorporation du marquage à la $^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ -Valine dans le tissu cérébrale de souris à J0, J10, J20, J30, J40. Exemple du peptide YLAEVAAGDDK de la protéine 1433Z_MOUSE (P63101). Rouge = peptide non marqué ; Bleu = peptide marqué.

2.3. Mesure du turnover

La mesure du *turnover* est fonction de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation propre à chaque protéine et de la pression de marquage propre à chaque tissu. La pression de

PARTIE 3 : Le turnover des protéines

marquage est évaluée par la détermination du RIA_{∞} . Celui-ci peut-être estimée par la probabilité r d'obtenir un marquage sur un peptide avec deux positions de marquages :

$$I_{LL} = (1 - r)^2$$

$$I_{HL} = I_{LH} = 2 \times r(1 - r)$$

$$I_{HH} = r^2$$

Soit,

$$r = \frac{2 \frac{I_{HH}}{I_{HL} + I_{LH}}}{1 + 2 \frac{I_{HH}}{I_{HL} + I_{LH}}}$$

La vitesse d'incorporation du marquage est fonction du tissu. Le calcul de r pour chacun des peptides à di-valine présente une tendance générale à 30% de marquage (figure 33). Comme vu précédemment le RIA_{∞} dépend exclusivement de la pression de marquage, soit du rapport valine non marquée/valine marquée disponible dans l'organisme.

Le RIA_{∞} est ainsi défini à 0,30, le calcul des *turnover* est donné par :

$$k = \frac{-\text{Ln} \left(1 - \frac{RIA_t}{RIA_{\infty}} \right)}{t}$$

On obtient alors un *turnover* moyen de 0,015^{-jour} pour les protéines du tissu cérébral. La moyenne du turnover cérébral est de 0,059^{-jour} pour l'équipe de Price¹¹⁶ (figure 34). On constate une différence des *turnover* obtenus. Cette différence peut s'expliquer par l'application d'une formule différente. En effet, pour le calcul du *turnover*, l'équipe de Price ne prend pas en compte le RIA_{∞} et définit l'équation suivante :

$$RIA(t) = 1 - e^{-kt} \quad 116$$

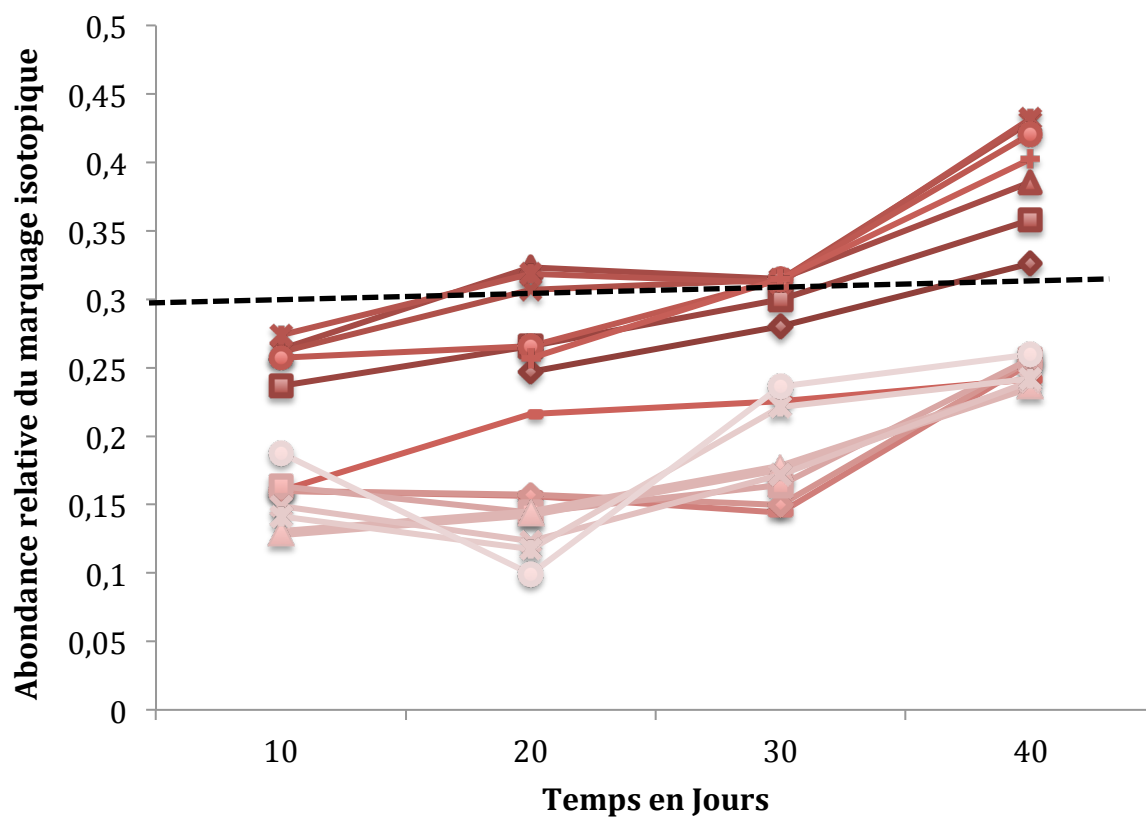


Figure 33 : Suivi du marquage isotopique in vivo sur des peptides di-valines de protéines cérébrales de souris marquées à la ^{13}C - ^{15}N -Valine pendant 40 jours.

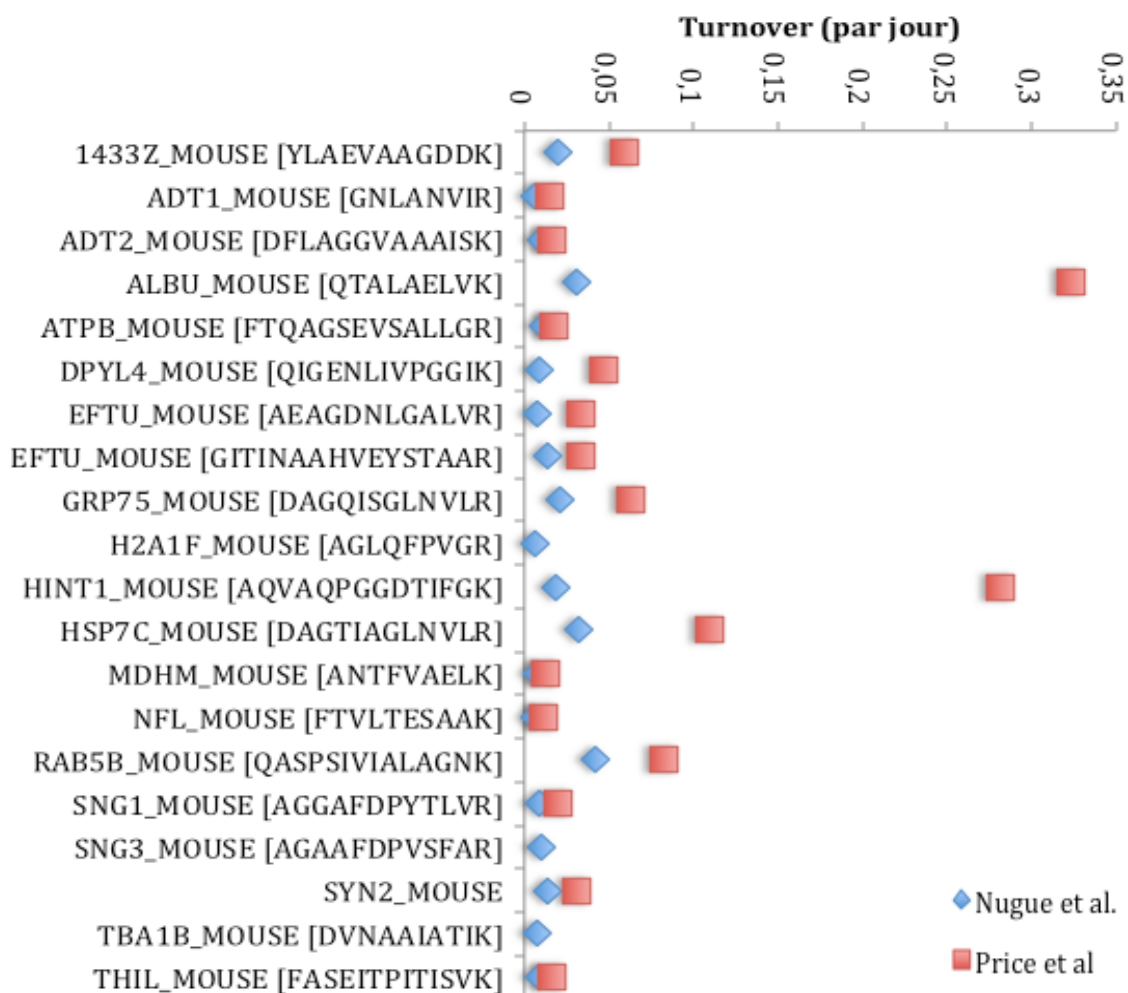


Figure 34 : Turnover de protéines cérébrale chez la souris ¹¹⁶.

3. Discussion

Les avancées réalisées ces dernières années ont permis de mettre en évidence des modifications moléculaires dans les gliomes. Alors que les études transcriptomiques montrent des modifications nettes, la corrélation au niveau des protéines n'est pas validée¹⁵. Les protéines représentent le versant fonctionnel des modifications impliquées dans le phénomène de cancérisation. L'étude fonctionnelle de la physiopathologie passe donc nécessairement par l'étude des protéines.

La dynamique des protéines est de plus en plus étudiée^{19,58,78,81,122}. Le perfectionnement des outils d'analyse principalement en spectrométrie de masse est un avantage certain pour ce type d'analyse. Pour étudier le renouvellement des protéines, il est nécessaire d'appliquer des méthodes de marquage isotopique métaboliques pour suivre l'incorporation d'acides aminés dans une protéine.

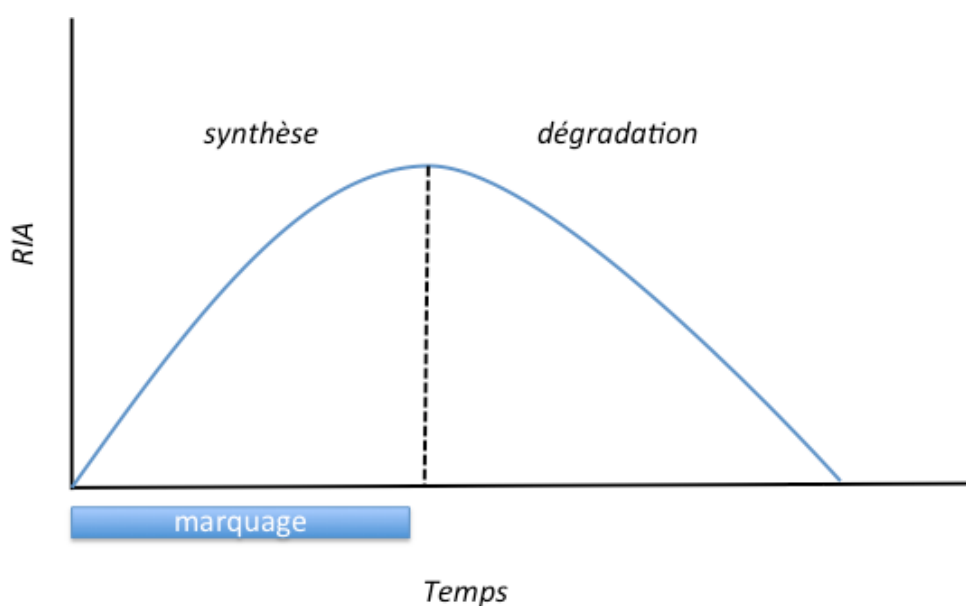


Figure 35 : Profil de la variation du RIA au court du temps pendant et après un marquage

Afin de d'étudier le *turnover* des protéines, il est nécessaire de réaliser un marquage de toutes les protéines néo-synthétisées à partir d'un temps t_0 dans le but d'estimer la vitesse

de synthèse. On peut compléter l'analyse pour la dégradation des protéines par la technique de *pulse chase*¹²³, c'est-à-dire, de décroissance du signal de marquage (figure 33).

Pour réaliser le marquage isotopique *in vivo*, la valine a été choisie du fait de plusieurs avantages. Dans un premier temps, il s'agit d'un acide aminé essentiel, indispensable afin de favoriser le marquage et de limiter toute contamination du marquage suite à la dégradation de l'acide aminé. De plus, la valine possède un avantage dans son occurrence (>6% des acides aminés des protéines), permettant d'obtenir un taux important des peptides mono marqués que des peptides doublement marqués et elle ne partage pas ses propriétés molaires avec un autre acide aminé. La valine peut cependant être dégradée en plusieurs métabolites. On peut donc suivre le marquage isotopique dans l'ensemble de la cascade de dégradation de la valine. La première étape de dégradation de la valine produit du glutamate (figure 34). En administrant de la valine marquée isotopiquement, on peut donc se retrouver dans une situation de dispersion du marquage. Afin de déterminer le turnover des protéines de façon fiable, nous avons vérifié que l'administration de la valine marquée n'était pas associée à une conversion importante en glutamate marqué. Les analyses LC-MS/MS réalisées sur des peptides comportant une valine marquée et un glutamate ont montré que l'incorporation de glutamate marqué était négligeable.

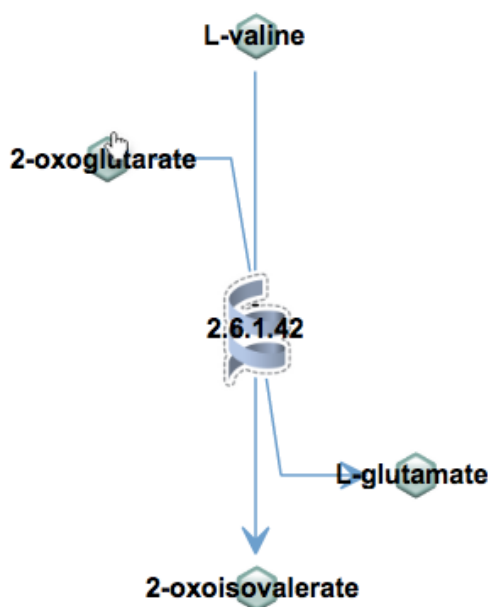


Figure 36 : Première étape de la dégradation de la valine chez l'homme

Nous avons pu mettre en place une stratégie innovante de mesure du *turnover* des protéines dans des conditions physiologiques par une approche ciblée. Celle-ci consiste en une analyse SRM. Au travers de cette analyse, on peut suivre une protéine d'intérêt avec une spécificité et une sensibilité d'analyse importante. De plus, la technique de LC-SRM est basée sur l'utilisation de spectromètre de masse de type triple quadrupoles ou QTRAP qui permettent une large gamme dynamique d'analyses adaptées au suivi de plusieurs protéines simultanées et faiblement abondantes.

La prochaine étape de ce travail sera de valider la technique de marquage isotopique sur un modèle xéno greffe humaine chez la souris. Au travers cette approche, on recherchera des protéines tumorales et nous pourrons mettre en évidence des variations de turnover de certaines dans la physiopathologie tumorale et la réponse à différents traitements. Cette stratégie nous donnera la possibilité de mettre en évidence des voies de signalisations impliquées aussi bien dans la réponse thérapeutique que dans la physiopathologie tumorale.

PARTIE 4 :

Essai clinique : CARBONOMIC

Etude du métabolisme tumoral par un marquage isotopique chez les patients atteints de gliomes de haut grade

Les études génomiques et transcriptomiques ont permis de mettre en évidence un nombre important de mutations dans les gliomes. Ces mutations sont actuellement utilisées comme biomarqueurs^{8,40}. Cependant l'utilisation de ces biomarqueurs nécessite un examen invasif (biopsie) pour l'analyse anatomopathologique. Dans un souci majeur de confort du patient, il est nécessaire de définir de nouvelles stratégies diagnostique, cependant, peu de biomarqueurs circulant sont utilisés et efficaces dans les gliomes. Des groupes travaillent actuellement sur l'ADN tumorale circulant, qui permettrait d'obtenir une confirmation par une simple biopsie liquide¹²⁴. Ces travaux se cloisonnent encore dans les phénomènes de métastases.

La recherche de biomarqueurs, permettant une amélioration de la prise en charge diagnostic mais aussi pronostic est un enjeu majeur en cancérologie. A ce jour les différentes approches utilisées se sont révélées insatisfaisantes^{12,13}; cette situation pourrait changer avec l'utilisation de nouveaux outils de hautes performances développés notamment en protéomique¹⁴. La connaissance du *turnover* protéique dans une tumeur permettrait d'identifier des protéines clés associées à la physiopathologie tumorale, qui si elles sont retrouvées en périphérie seraient des biomarqueurs de choix. Cette technique a été validée aussi bien chez le rongeur¹⁷ que le chez poulet¹⁸ en ce qui concerne l'étude du *turnover* protéique dans une situation physiologique. Cette approche a également été utilisée chez l'homme par l'équipe de Holtzman aux USA dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative ou la β -Amyloïde Utilisant un marquage isotopique au carbone 13 d'un acide aminé essentiel, la leucine (¹³C₆-Leucine), cette équipe a pu mesurer le *turnover* de la protéine β -Amyloïde, dont l'agrégation dans les plaques amyloïdes constitue un évènement important de la physiopathologie¹⁹. Ce travail démontre la faisabilité de l'utilisation d'un acide aminé enrichi au carbone 13 pour suivre le turnover de protéine chez l'homme.

Nos travaux initiaux sur le *turnover* des protéines, nous ont permis de définir des paramètres et une expertise dans le marquage isotopique *in vivo*. Les glioblastomes sont des tumeurs à cinétique rapide alors que le tissu cérébral est lui un tissu stable à cinétique lente. On peut observer ce phénomène en imagerie nucléaire. Lors d'un examen clinique en médecine nucléaire, le PET (¹¹C-méthionine, ¹⁸FDG) met en évidence les zones tumorales par l'accumulation massive de radiotraceurs du fait de la dynamique importante de la tumeur¹²⁵. On peut donc imaginer que chez les patients atteints de glioblastomes, le marquage isotopique stable se localisera essentiellement au niveau de la tumeur du fait d'une dynamique importante de celle-ci.

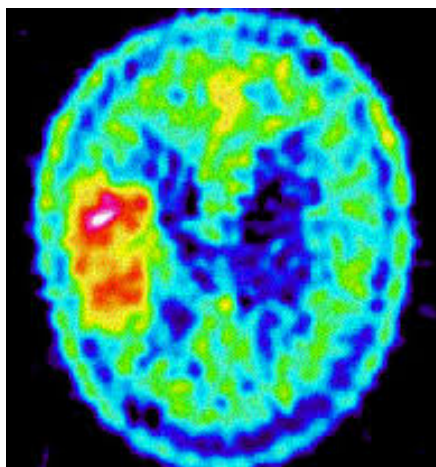


Figure 37 : Imagerie nucléaire d'un glioblastome

Une revue de la littérature met en évidence un nombre important d'essais cliniques utilisant un acide aminé marqué pour l'étude physiopathologique d'une maladie (tableau 15).

Tableau 15 : Etudes décrivant un essai clinique avec un marquage isotopique stable

Equipe	Localisation	Année	Marquage	Nombre Patient
Tanaka K et al. 72	Etats-Unis	1975	¹³ C Valine	1 enfant de 7 ans
Lichtenstein et al. 118.	Etats-Unis	1990	² H ₃ -Leucine, ² H ₃ -Valine, ¹³ C ₂ -Lysine	3 volontaires sains
Bateman RJ et al. 19	Etats-Unis	2006	¹³ C ₆ -Leucine	10 (7 hommes et 3 femmes)
Steiner SJ et al. 119	Etats-Unis	2007	d5-Phénylalanine + ¹³ C-Leucine	15 enfants
Van Den Akker CH et al. 120	Pays-Bas	2011	¹³ C- ¹⁵ N-Leucine, ¹³ C ₅ -Valine, ¹³ C-Méthionine	8 femmes enceintes

1. Objectifs de l'étude

Ce projet porte sur l'étudier du *turnover* protéique dans des glioblastomes par l'analyse en spectrométrie de masse du suivi de l'incorporation de ¹³C-valine. Cette étude permettra l'identification de protéines circulantes sécrétées par la tumeur en périphérie dont on

évaluera la valeur comme biomarqueurs diagnostique et pronostique chez des patients atteints de gliomes de haut grade.

Le présent objectif s'inscrit dans le cadre d'un projet INCa/DGoS qui consiste en l'étude de la dynamique des protéines tumorales par une technique de marquage isotopique non radioactif (carbone 13 et azote 15) *in vivo*. Cette étude se concentre sur le *turnover* de protéines impliquées dans la pathologie au niveau tissulaire (tissus tumoral) et périphérique (plasma sanguin). Le *turnover* des protéines sera mesuré au travers le marquage isotopique au niveau du protéome. Il nous sera ainsi possible de compléter l'identification génomique et transcriptomique par une identification protéomique de la pathologie.

2. Balance bénéfique/risque

Dans cette étude, le bénéfice est collectif et permettra à terme de faire progresser les connaissances sur la pathologie étudiée permettant l'identification de protéines circulantes sécrétées par la tumeur en périphérie dont on évaluera la valeur comme biomarqueurs diagnostique et pronostique chez des patients atteints de gliomes de haut grade.

Un grand nombre d'essais cliniques sont menés dans le monde utilisant des acides aminés avec marquage isotopique (Tableau 16). A ce jour aucun effet délétère n'est mis en évidence suite à l'administration du marquage isotopique.

Un surdosage de valine peut provoquer des hallucinations et des fourmillements cutanés.

Tableau 16 : Essais cliniques réalisés avec des molécules avec marquage isotopique

Site	Investigateur	Numéro	date	Marquage	Nombre de patient	condition	Administration
Belgique	Merck Sharp & Dohme Corp	NCT00860392	2009	¹³ C(4)-BHB	24	sains	5 heures
Saint Louis Children's Hospital, Etats-Unis	Aaron Hamvas, MD	NCT00828451	2009	5,5,5- ² H ₃ Leucine	48 (estimation)	-	IV dans 5% glucose, 1.8ml/kg/5 min puis 1,8ml/h pendant 6 heures
CHU Clermont-Ferrand, France	Patrick LACARIN	NCT01114789	2010	¹³ C-leucine, d5-phenylalanine	40 (estimation)	hemodialyse	-
Indiana University - Riley Hospital for Children, Etats-Unis	Steven J Steiner, MD	NCT00586352	2011	Isotope stable	-	Maladie intestinale inflammatoire pédiatrique	IV pendant 3h. Dosage dépendant du poids.
Indianapolis, Indiana, Etats-Unis	Steven J Steiner, MD	NCT00583232	2011	isotope stable	-	Maladie de Crohn	IV bolus + infusion continue
The Hospital for Sick Children Toronto, Ontario, Canada	Dr. Paul Pencharz	NCT01912235	2013	2- ¹⁵ N glutamine ; ¹⁵ N ₂ -arginine + ¹⁵ N-proline ; 1- ¹³ C glutamine	5 hommes	sains	-
Mayo clinic, Etats-Unis	Dawn Milliner	NCT02038543	2013	Hydroxyproline et Leucine	-	-	IV

3. Protocole clinique

Dans la poursuite de l'étude du *turnover* des protéines tumorales, nous avons mis en place un essai clinique en court d'autorisation auprès de l'ANSM. Au travers de cet essai clinique, nous rechercherons une variation du *turnover* de protéines avant et après une exérèse chirurgicale dans les glioblastomes.

Cette étude se concentre sur l'étude du *turnover* protéique impliqué dans la pathologie à la fois au niveau tissulaire (tissus tumoral) et périphérique (plasma sanguin) par l'étude du protéome tumoral marqué. Il nous sera ainsi possible de compléter l'identification génomique et transcriptomique par une identification protéomique de la pathologie.

Le patient arrive le soir au centre de recherche Clinatec. Il reçoit un repas adapté (pauvre en valine). Une voie intraveineuse est posée afin d'assurer l'infusion de $^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ -valine à raison d'un bolus de 2 mg/kg/10 min puis de 2 mg/kg/h sur une période de 9h à partir de minuit. Au terme de ces 9h et 10 min, le patient peut bénéficier immédiatement de l'exérèse chirurgicale.

Le patient est mis au repos pendant toute la durée de l'analyse (éviter au maximum les mouvements). Quelques heures avant le début de l'injection de la valine marquée, une alimentation adaptée sera mise en place afin de limiter l'apport en valine non marquée et d'augmenter l'efficacité du marquage. Cette alimentation sera la plus pauvre possible en valine sans pour autant que le patient n'en ressente une gêne. Ainsi nous nous baserons sur le régime alimentaire utilisé dans les cas de leucineose ¹²⁶. Afin qu'il commence son régime à domicile, la liste d'aliments sera transmise au patient :

Aliments à proscrire	Aliments à favoriser
- Œuf	- Choux
- Produits laitiers	- Pain
- Viande	- Betterave
- Graine	
- Soja	
- arachide	

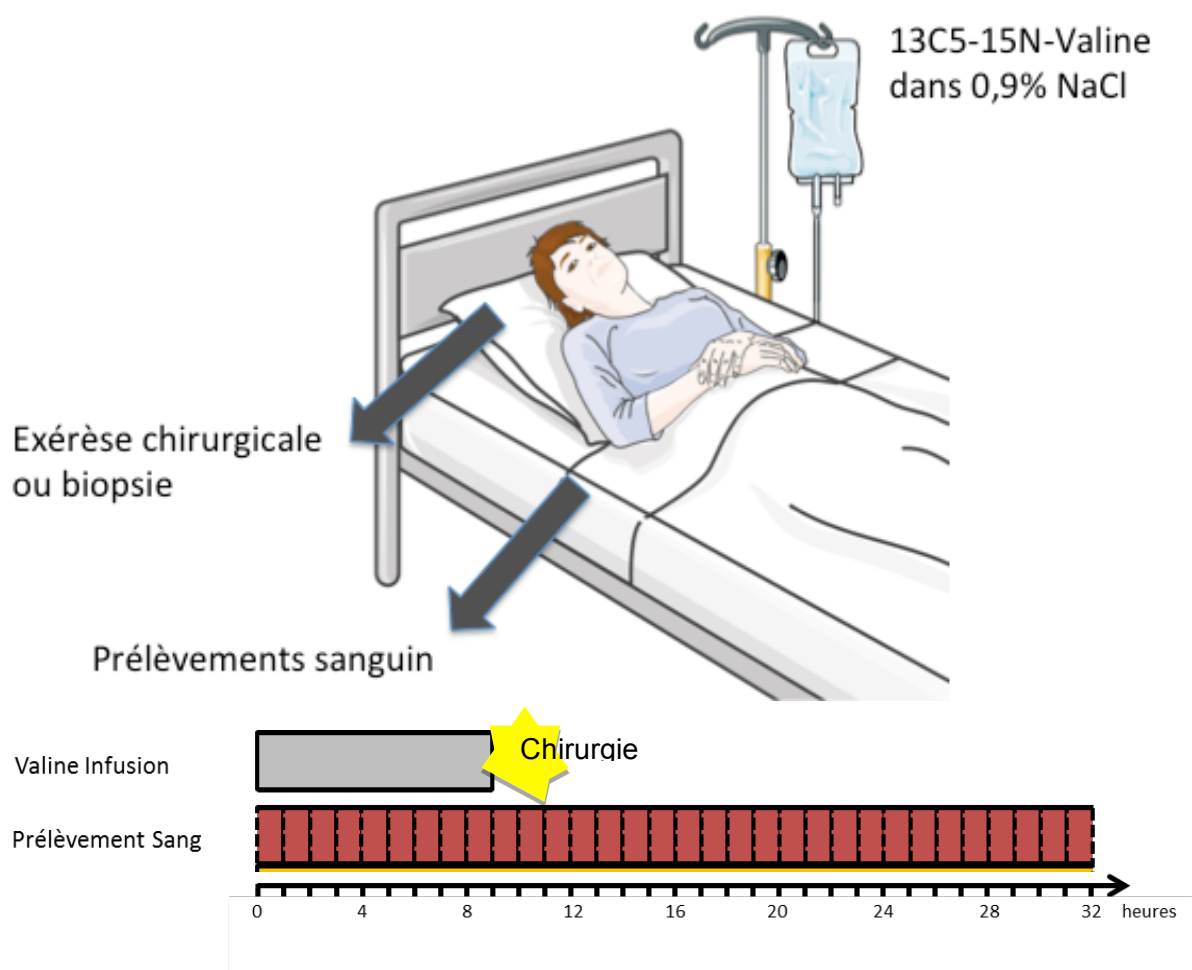


Figure 38 : schéma du protocole clinique

Des prélèvements sanguins seront réalisés toutes les heures pendant 32h afin de suivre l'évolution du marquage isotopique.

En cas de récurrence, un prélèvement sanguin sera réalisé pour un contrôle du protéome. La récurrence sera confirmée en se basant sur les critères de Macdonald ou par l'apparition de troubles neurologiques ainsi qu'une IRM de contrôle.

Tableau 17 : Schéma des doses injectées en fonction du poids des patients

Poids Patient (kg)	quantité administrée (mg)	volume (ml)	Bolus 10 min	Infusion 9h
			débit 1 (ml/min)	débit 2 (ml/min)
50-65	1200	171	1,71	0,29
66-75	1400	200	2,00	0,33
76-85	1600	229	2,29	0,38
86-100	1800	257	2,57	0,43

Une IRM et une prise de sang mensuelle pour évaluer le turnover des protéines seront réalisés tous les 3 mois jusqu'à 2 ans après l'inclusion.

4. Dossier pharmaceutique

Le médicament expérimental concerné est une préparation stérile de $^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ -Valine à 5mg/ml.

4.1. Documents techniques

Les matières premières qui entrent dans la fabrication de la solution stérile de $^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ -Valine sont :

- $^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ -Valine fourni par EURISOTOP
- solution de chlorure de sodium 0,9% fournie par B BRAUN

La société EURISOTOP nous fournit un bulletin d'analyse conforme aux bonnes pratiques pharmaceutiques.

4.2. Qualification de la Valine marquée

La $^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ -Valine ne possède pas de monographie dans la Pharmacopée Européenne. Dans ce contexte, les bonnes pratiques pharmaceutiques exigent une expertise physico-chimique, microbiologique et toxicologique avant son utilisation dans un essai clinique comme médicament expérimental.

Tous les résultats des analyses physico-chimiques, microbiologiques et toxicologies sont conformes aux spécifications attendues (tableau 18).

Tableau 18 : Synthèse de la qualification de la valine marquée

Test	Pharmacopée Européenne	Résultats
Pouvoir rotatoire spécifique	2.2.7	+26,5° à +29°
Chlorures	2.4.4	≤ 200 ppm
Sulfates	2.4.13	≤ 300 ppm
Fer	2.4.9	≤ 10 ppm
Métaux lourds	2.4.8	≤ 10 ppm
Perte à la dessiccation	2.2.32	≤ 0,5 %
Cendres sulfuriques	2.4.14	≤ 0,1 %
Enrichissement isotopique	-	≥ 99 %
Toxicité anormale	2.6.9	Aucune létalité sur les animaux à 4 jours
Dosage des endotoxines bactériennes	2.6.14	< 0,05 UI/mg
Dosage de la valine sur substance desséchée	-	98,5 % à 101,0 %

4.3. Stabilité de la solution stérile

Des flacons bruns de 10 ml sont remplis à 3 ml avec une solution de $^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ -Valine à 5 mg/ml. Pendant toute la durée de l'étude, les flacons sont conservés à +5°C et 25 °C. L'étude de la stabilité est basée sur l'évaluation des critères qualité suivant à différents temps sur une période de 1 an :

- Dosage de la $^{13}\text{C}_5\text{-}^{15}\text{N}$ -Valine
- Mesure de l'enrichissement isotopique
- Comptage de particules non visibles
- Mesure du pH

PARTIE 4 : Essai clinique –CARBONOMIC

- Mesure de l'osmolarité
- Mesure du sodium
- Dosage des endotoxines bactériennes
- Essai de stérilité

A ce stade, seul la stabilité à 3 mois a été effectuée. Les résultats sont conformes aux spécificités recommandées.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Les avancées de ces dernières années en cancérologie ont mis en évidence une grande variabilité des réponses aux thérapies utilisées. Dans le traitement des tumeurs cérébrales, la chirurgie est, à ce jour, le traitement montrant le maximum d'efficacité dans le traitement des gliomes de haut grade ¹²⁷. Cependant, dans les tumeurs cérébrales de haut grade, la chirurgie est limitée par les cellules tumorales infiltrantes, limitant la résection tumorale à une exérèse macroscopique. On complète alors la chirurgie par une radiochimiothérapie concomitante suivi d'une chimiothérapie adjuvante. Malgré des stratégies thérapeutiques combinatoires (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie), le pronostic reste sombre avec une médiane de survie à 15 mois pour les glioblastomes ⁶, du fait d'un échappement thérapeutique quasi systématique. Cet échappement thérapeutique peut s'expliquer en partie par une importante hétérogénéité tumorale au sein même de la tumeur ⁷ laissant apparaître des tissus résistants au traitement et également par le tissu tumoral infiltrant peu accessible aux méthodes thérapeutiques actuelles.

De ces faits, des stratégies innovantes ont été développées, au travers de molécules biologique comme les anticorps monoclonaux, capable d'inhiber un processus biologique clé dans le phénomène de cancérisation. Sur ce principe, N. Ferrara a développé le bevacizumab ^{85,128}. Alors que celui-ci ait montré des résultats intéressants dans le traitement des glioblastomes avec une amélioration de la survie sans progression, la survie globale reste stable ⁵⁹.

On peut observer une variation interindividuelle de l'effet du bevacizumab dans le traitement des glioblastomes chez les patients, que l'on peut associer à une variabilité de la concentration systémique en anticorps monoclonal thérapeutique malgré un protocole d'administration identique. Trois groupes de patients ont été mis en évidence. Les patients avec une concentration sérique moyenne et une bonne réponse au traitement. Des patients avec des concentrations basses conservaient une néo angiogenèse résiduelle à l'imagerie clinique. Et un groupe plus problématique, avec l'apparition d'effets secondaires corrélés à des concentrations sériques en bevacizumab supérieures à la moyenne. Nous avons donc proposé d'ajuster les administrations de bevacizumab en fonction du dosage de celui-ci. L'ajustement de la concentration sérique de bevacizumab chez le patient se ferait autour d'une concentration biologique efficace afin d'éviter tout surdosage et tout sous dosage.

Cependant, dans le traitement des gliomes, on se retrouve vite confronté à l'obstacle de la barrière hémato-encéphalique. La BHE limite l'accessibilité des molécules thérapeutiques à la zone pathologique. Dans le but de favoriser la bio-distribution de drogue dans la tumeur,

CONCLUSION et PERSPECTIVES

plusieurs stratégies de contournement de la BHE ont été proposées dans la littérature. La délivrance localisée (CED) de drogue directement dans la tumeur est l'une ces stratégies ²⁸. Nous avons expérimenté cette technique au travers un essai préclinique. On peut constater que la CED améliore significativement la survie des animaux contre une administration IP. De plus nous avons volontairement réduit la quantité injectée par CED. L'effet du bevacizumab est amélioré dans une administration CED et les effets secondaires sont limités par une bio-distribution périphérique limitée. On constate qu'une concentration en bevacizumab est détectée dans la partie cérébrale contralatérale de la tumeur et du point d'injection. Ceci montre l'intérêt d'utiliser la CED dans le traitement des glioblastomes, permettant d'atteindre le tissu tumoral infiltrant et permettant une limitation probable de récurrence.

Le traitement des tumeurs cérébrales est donc un véritable challenge pour les cliniciens. Il est aujourd'hui difficile d'obtenir une amélioration significative de la survie globale dans le traitement des glioblastomes. Les nouvelles stratégies thérapeutiques utilisées en oncologie, à l'exemple du bevacizumab, montrent des limites d'efficacité. Il est vrai que l'on constate une amélioration de la survie sans récurrence, mais la survie globale reste inchangée ⁵⁹. L'arrivée de nouvelle stratégie de délivrance localisée permettrait très probablement d'améliorer la réponse thérapeutique des nouvelles drogues ayant des effets limités dans les pathologies cérébrale du fait de la BHE.

Afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques et de réponses aux drogues, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies pouvant suivre la dynamique fonctionnelle de la maladie. Le marquage isotopique du protéome par un enrichissement isotopique d'un acide aminé permet ce type d'analyse. L'amélioration de technique comme la spectrométrie de masse rend possible de discriminer des protéines possédant un acide aminé enrichi en isotope stable comme le carbone 13, le deutérium ou encore l'azote 15.

Cette technique est utilisée initialement en protéomique dans des études *in vitro* de SILAC. Il devient alors possible de comparer le protéome de deux populations cellulaires. Cependant, il est difficile dans ces conditions d'étudier la dynamique du protéome. Les études de métabolomique du début du XXe siècle peuvent nous donner la solution. Ils utilisaient alors un traceur, souvent radioactif, qu'ils suivaient pour définir les voies de synthèse et de dégradation de molécules ⁶³. Le marquage isotopique stable *in vivo* peut aujourd'hui permettre d'étudier la dynamique des protéine ¹²⁹. Il s'agit d'une nouvelle approche de la protéomique qui peut mettre en évidence les synthèses et dégradations du protéome. Le

CONCLUSION et PERSPECTIVES

perfectionnement des outils d'analyse principalement en spectrométrie de masse est un avantage certain pour ce type d'analyse.

Nous avons choisi de faire cette étude par une technique de protéomique ciblée de type SRM (*Selective Reaction Monitoring*). La SRM utilise un spectromètre de masse de type QTRAP qui permet une analyse spécifiquement les peptides signatures présélectionnés avec une bonne sensibilité ⁷⁴. Par LC-SRM, on peut suivre des protéines d'intérêt par l'analyse de peptides signatures permettant de confirmer la présence d'une protéine, combinée à un marquage isotopique stable sur un acide aminé, on peut ainsi contrôler le *turnover* de ces protéines et mettre en évidence des variations clés dans la physiopathologie tumorale.

Pour la première fois, le *turnover* tumoral sera étudié chez le patient. Afin d'obtenir une analyse la plus complète possible, une analyse protéomique par SRM du tissu tumoral et du sang seront réalisées. Il sera cependant nécessaire de travailler avec des outils protéomiques moins spécifiques afin de mettre en évidence des modifications de *turnover* dans les phénomènes de cancérisations et/ou de réponse, de résistance thérapeutique.

Il est bien évident que la technique de SRM ne nous permettra pas de découvrir de nouvelles protéines clés dans la pathologie. Il sera nécessaire de présélectionner des protéines d'intérêt pouvant être identifiées dans la littérature mais également sur des analyses protéomiques préliminaires de type orbitrap, nous permettant l'accès à une large identification protéique.

Au travers nos premiers résultats, nous avons travaillé sur la mise en place d'un essai clinique en cours d'autorisation auprès des autorités. Cet essai clinique aura pour but de mettre en évidence une adaptation fonctionnelle des protéines des tumeurs gliales avant et après une exérèse chirurgicale au travers d'un *turnover* protéique modifié. Cet essai clinique se réalisera au sein du centre Clinatéc, dans lequel une équipe multidisciplinaire permettra de mettre en évidence des candidats biomarqueurs protéiques à l'aide d'un marquage isotopique *in vivo* directement chez le patient. Un patient bénéficiera d'une analyse complète combinant l'hétérogénéité tumorale, une analyse génomique, transcriptomique tout en analysant le *turnover* des protéines.

Bibliographie

1. Globocan 2012 - Home. at <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>
2. CépiDc - causes médicales de décès. at <<http://www.cepidc.inserm.fr/site4/>>
3. Ricard, D. *et al.* Primary brain tumours in adults. *The Lancet* **379**, 1984–1996
4. Institut national de la statistique et des études économiques: Accueil. at <<http://www.insee.fr/fr/>>
5. Wen, P. Y. & Kesari, S. Malignant Gliomas in Adults. *New England Journal of Medicine* **359**, 492–507 (2008).
6. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* **352**, 987–996 (2005).
7. Gerlinger, M. *et al.* Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal of Medicine* **366**, 883–892 (2012).
8. Hartmann, C. *et al.* Molecular Markers in Low-Grade Gliomas: Predictive or Prognostic? *Clin Cancer Res* **17**, 4588–4599 (2011).
9. Jenkins, R. B. *et al.* A t(1;19)(q10;p10) Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendroglioma. *Cancer Res* **66**, 9852–9861 (2006).
10. Kloosterhof, N. K., Bralten, L. B., Dubbink, H. J., French, P. J. & van den Bent, M. J. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma? *The Lancet Oncology* **12**, 83–91 (2011).
11. Hegi, M. E. *et al.* MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* **352**, 997–1003 (2005).
12. Diamandis, E. P. Cancer Biomarkers: Can We Turn Recent Failures into Success? *JNCI J Natl Cancer Inst* **102**, 1462–1467 (2010).
13. Issaq, H. J., Waybright, T. J. & Veenstra, T. D. Cancer biomarker discovery: Opportunities and pitfalls in analytical methods. *ELECTROPHORESIS* **32**, 967–975 (2011).
14. Liotta, L. A. & Petricoin, E. Cancer Biomarkers: Closer to Delivering on their Promise. *Cancer Cell* **20**, 279–280 (2011).
15. Schwanhäusser, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression

control. *Nature* **473**, 337–342 (2011).

16. Ong, S.-E. *et al.* Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**, 376–386 (2002).

17. Zanivan, S., Krueger, M. & Matthias Mann. In vivo quantitative proteomics: the SILAC mouse. *Methods Mol. Biol.* **757**, 435–450 (2012).

18. Doherty, M. K., Whitehead, C., McCormack, H., Gaskell, S. J. & Beynon, R. J. Proteome dynamics in complex organisms: using stable isotopes to monitor individual protein turnover rates. *Proteomics* **5**, 522–533 (2005).

19. Bateman, R. J. *et al.* Human amyloid- β synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nature Medicine* **12**, 856–861 (2006).

20. Duffy, M. J. & Crown, J. Companion biomarkers: paving the pathway to personalized treatment for cancer. *Clin. Chem.* **59**, 1447–1456 (2013).

21. Jensen, E. V., Block, G. E., Smith, S., Kyser, K. & DeSombre, E. R. Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *Natl Cancer Inst Monogr* **34**, 55–70 (1971).

22. McGuire, W. L. Estrogen receptors in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* **52**, 73–77 (1973).

23. Chia, S. K. & Wolff, A. C. With maturity comes confidence: EBCTCG tamoxifen update. *Lancet* **378**, 747–749 (2011).

24. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) *et al.* Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **378**, 771–784 (2011).

25. Zhu, X., Wu, S., Dahut, W. L. & Parikh, C. R. Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis.* **49**, 186–193 (2007).

26. Fan, Y.-S. Companion diagnostic testing for targeted cancer therapies: an overview. *Genet Test Mol Biomarkers* **17**, 515–523 (2013).

27. Ranpura, V., Hapani, S. & Wu, S. Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *JAMA* **305**, 487–494 (2011).

28. Bobo, R. H. *et al.* Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 2076–2080 (1994).

29. Ferguson, S. D., Foster, K. & Yamini, B. Convection-enhanced delivery for treatment of brain tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* **7**, S79–85 (2007).

30. Vries, H. E. de, Kuiper, J., Boer, A. G. de, Berkel, T. J. C. V. & Breimer, D. D.

The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory Diseases. *Pharmacol Rev* **49**, 143–156 (1997).

31. Ostrom, Q. T. *et al.* The epidemiology of glioma in adults: a ‘state of the science’ review. *Neuro Oncol* **16**, 896–913 (2014).

32. Zülch, K. J. & Organization, W. H. Types histologiques des tumeurs du système nerveux central / K. J. Zülch, avec la collaboration de pathologistes de 14 pays. (1979). at <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/37743>>

33. Bailey P, C. H. A classification of the tumours of the glioma group on a histogenetic basis, with a correlated study of prognosis. By Percival Bailey and Harvey Cushing. Medium 8vo. Pp. 175, with 108 illustrations. 1926. Philadelphia, London, and Montreal: J. B. Lippincott Company. 21s. net. *Br J Surg* **14**, 554–555 (1926).

34. KERNOHAN, J. W. & MABON, R. F. A simplified classification of the gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin* **24**, 71–75 (1949).

35. Kleihues, P., Burger, P. C. & Scheithauer, B. W. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol.* **3**, 255–268 (1993).

36. Kleihues P & Cavenee WK. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. *IARC Press* (2000).

37. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* **114**, 97–109 (2007).

38. Appin, C. L. & Brat, D. J. Molecular genetics of gliomas. *Cancer J* **20**, 66–72 (2014).

39. Erdem-Eraslan, L. *et al.* Intrinsic Molecular Subtypes of Glioma Are Prognostic and Predict Benefit From Adjuvant Procarbazine, Lomustine, and Vincristine Chemotherapy in Combination With Other Prognostic Factors in Anaplastic Oligodendroglial Brain Tumors: A Report From EORTC Study 26951. *JCO* **31**, 328–336 (2013).

40. Weller, M. *et al.* Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. *The Lancet Oncology* **14**, e370–e379 (2013).

41. Gerson, S. L., Reese, J. & Kenyon, J. DNA repair in stem cell maintenance and conversion to cancer stem cells. *Ernst Schering Found Symp Proc* 231–244 (2006).

42. McLendon, R. *et al.* Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061–1068 (2008).

43. Preusser, M. *et al.* Current concepts and management of glioblastoma. *Annals of Neurology* **70**, 9–21 (2011).

44. Carpentier, A. C. La chirurgie des gliomes cérébraux en 2008. *Cancer/Radiothérapie* **12**, 676–686 (2008).
45. Cortnum, S. & Laursen, R. J. Fluorescence-guided resection of gliomas. *Dan Med J* **59**, A4460 (2012).
46. Sheline, G. E. The importance of distinguishing tumor grade in malignant gliomas: Treatment and prognosis. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* **1**, 781–786 (1976).
47. Walker, M. D. *et al.* Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. *Journal of Neurosurgery* **49**, 333–343 (1978).
48. Mahaley MS, JR., ODOM GL & WOODHALL B. Histological changes after regional chemotherapy: Brain and face tumors. *Arch Surg* **87**, 765–774 (1963).
49. Shapiro, W. R. & Young, D. F. Chemotherapy of malignant glioma with CCNU alone and CCNU combined with vincristine sulfate and procarbazine hydrochloride. *Transactions of the American Neurological Association* **101**, 217–220 (1976).
50. Bent, M. J. van den *et al.* Adjuvant Procarbazine, Lomustine, and Vincristine Chemotherapy in Newly Diagnosed Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Follow-Up of EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *JCO* **31**, 344–350 (2013).
51. Goerne, R., Bogdahn, U. & Hau, P. Procarbazine – A Traditional Drug in the Treatment of Malignant Gliomas. *Current Medicinal Chemistry* **15**, 1376–1387 (2008).
52. Newlands, E. S., Stevens, M. F. G., Wedge, S. R., Wheelhouse, R. T. & Brock, C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatment Reviews* **23**, 35–61 (1997).
53. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1182–1186 (1971).
54. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257 (2000).
55. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843–845 (1992).
56. Davies, S., H, R., M, C. & P, C. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. (2000). at <<http://www.biochemj.org.gate2.inist.fr/bj/351/0095/bj3510095.htm>>
57. Cohen, P. Protein kinases — the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews Drug Discovery* **1**, 309–315 (2002).
58. Zhang, Y. *et al.* Proteome Scale Turnover Analysis in Live Animals Using Stable Isotope Metabolic Labeling. *Anal. Chem.* **83**, 1665–1672 (2011).

59. Chinot, O. L. *et al.* Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* **370**, 709–722 (2014).
60. Farias-Eisner, G. *et al.* Glioblastoma biomarkers from bench to bedside: advances and challenges. *Br J Neurosurg* **26**, 189–194 (2011).
61. Colman, H. *et al.* A multigene predictor of outcome in glioblastoma. *Neuro-Oncology* **12**, 49–57 (2010).
62. Riemenschneider, M. J., Jeuken, J. W. M., Wesseling, P. & Reifenberger, G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* **120**, 567–584 (2010).
63. Schoenheimer, R. & Rittenberg, D. DEUTERIUM AS AN INDICATOR IN THE STUDY OF INTERMEDIARY METABOLISM. *Science* **82**, 156–157 (1935).
64. Thomson, J. J. RADIOACTIVITY. *Science* **92**, 207–210 (1940).
65. Ruben, S. & Kamen, M. D. Radioactive Carbon in the Study of Respiration in Heterotrophic Systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **26**, 418 (1940).
66. Godwin, H. Half-life of Radiocarbon. *Nature* **195**, 984–984 (1962).
67. Furlong, N. B., Watson, E. J. P., Davis, W. E. & Griffin, A. C. The Effect of Tumor Fractions on the Uptake of Carbon-14-Labeled Adenine into the Deoxyribonucleic Acids of Mouse Tissues. *Cancer Res* **15**, 710–714 (1955).
68. Graham, J. D. P. & Nicholls, P. J. Distribution of [14c]bemegrade in tissues after intravenous injection. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* **14**, 35 (1959).
69. Whipple, G. H., Hill, R. B., Terry, R., Lucas, F. V. & Yuile, C. L. The Placenta and Protein Metabolism Transfer Studies Using Carbon14-Labeled Proteins in Dogs. *J Exp Med* **101**, 617–626 (1955).
70. Wood, H. G., Gillespie, R., Hansen, R. G., Wood, W. A. & Hardenbrook, H. J. Arteriovenous ¹⁴CO₂ differences and the pentose cycle in the cow's udder. *Biochemical Journal* **73**, 694 (1959).
71. Rabi, I. I. The Atomic Nucleus, A New World to Conquer. *Science* **108**, 673–675 (1948).
72. Tanaka, K. *et al.* [13C]Valine metabolism in methylmalonicacidemia using nuclear magnetic resonance: propionate as an obligate intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 3692–3696 (1975).
73. De Hoffmann, E. Tandem mass spectrometry: A primer. *J. Mass Spectrom.* **31**, 129–137 (1996).
74. Lange, V., Picotti, P., Domon, B. & Aebersold, R. Selected reaction monitoring

for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology* **4**, (2008).

75. Kondrat, R. W., McClusky, G. A. & Cooks, R. G. Multiple reaction monitoring in mass spectrometry/mass spectrometry for direct analysis of complex mixtures. *Anal. Chem.* **50**, 2017–2021 (1978).

76. Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S. A., Gygi, S. P. & Kirschner, M. W. Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* **107**, 715–726 (2001).

77. Dupuis, A., Hennekinne, J.-A., Garin, J. & Brun, V. Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. *Proteomics* **8**, 4633–4636 (2008).

78. White, A. The Dynamic State of Body Constituents. *Yale J Biol Med* **14**, 677 (1942).

79. Zanivan, S., Krueger, M. & Mann, M. in *Integrin and Cell Adhesion Molecules* (ed. Shimaoka, M.) **757**, 435–450 (Humana Press, 2012).

80. Claydon, A. J. & Beynon, R. Proteome Dynamics: Revisiting Turnover with a Global Perspective. *Mol Cell Proteomics* **11**, 1551–1565 (2012).

81. Claydon, A. J., Thom, M. D., Hurst, J. L. & Beynon, R. J. Protein turnover: Measurement of proteome dynamics by whole animal metabolic labelling with stable isotope labelled amino acids. *PROTEOMICS* **12**, 1194–1206 (2012).

82. Scolnik, P. A. mAbs: a business perspective. *MAbs* **1**, 179–184 (2009).

83. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).

84. Bouzid, K., Bedairia, N. & Marty, M. Anticorps monoclonaux thérapeutiques en cancérologie. *Pathologie Biologie* **60**, 223–228 (2012).

85. Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H.-P. & Novotny, W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**, 391–400 (2004).

86. Cohen, M. H., Shen, Y. L., Keegan, P. & Pazdur, R. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin®) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *The Oncologist* **14**, 1131–1138 (2009).

87. Mould, D. R. & Green, B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies: concepts and lessons for drug development. *BioDrugs* **24**, 23–39 (2010).

88. Ordás, I., Mould, D. R., Feagan, B. G. & Sandborn, W. J. Anti-TNF Monoclonal Antibodies in Inflammatory Bowel Disease: Pharmacokinetics-Based Dosing Paradigms. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **91**, 635–646 (2012).

89. Avastin USPI Master File - December 2013.doc - avastin_prescribing.pdf. at

<http://www.gene.com/download/pdf/avastin_prescribing.pdf>

90. Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H.-P. & Novotny, W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 391–400 (2004).
91. Hurwitz, H. *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2335–2342 (2004).
92. Lu, J.-F. *et al.* Clinical pharmacokinetics of bevacizumab in patients with solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **62**, 779–786 (2008).
93. Ternant, D. *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay to study bevacizumab pharmacokinetics. *Ther Drug Monit* **32**, 647–652 (2010).
94. Miles, D. W. *et al.* Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3239–3247 (2010).
95. Reardon, D. A. *et al.* Phase II study of carboplatin, irinotecan, and bevacizumab for bevacizumab naïve, recurrent glioblastoma. *J. Neurooncol.* **107**, 155–164 (2012).
96. Houser, B. Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Archives Of Physiology And Biochemistry* **118**, 192–196 (2012).
97. SH-GTA-04 (Objet <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04> application/pdf). at <<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>>
98. Mould, D. R. & Sweeney, K. R. D. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies--mechanistic modeling applied to drug development. *Curr Opin Drug Discov Devel* **10**, 84–96 (2007).
99. Margolin, K. *et al.* Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: pharmacologic and long-term safety data. *J. Clin. Oncol.* **19**, 851–856 (2001).
100. Kim, J. *et al.* Albumin turnover: FcRn-mediated recycling saves as much albumin from degradation as the liver produces. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G352–360 (2006).
101. Wilkinson, G. R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2211–2221 (2005).
102. Pardridge, W. M. Blood–brain barrier delivery. *Drug Discovery Today* **12**, 54–61 (2007).
103. Burkhardt, J.-K. *et al.* Intra-Arterial Delivery of Bevacizumab after Blood-Brain Barrier Disruption for the Treatment of Recurrent Glioblastoma: Progression-Free

Survival and Overall Survival. *World Neurosurgery* **77**, 130–134 (2012).

104. Morrison, P. F., Laske, D. W., Bobo, H., Oldfield, E. H. & Dedrick, R. L. High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **266**, R292–R305 (1994).

105. Raghavan, R. *et al.* Convection-enhanced delivery of therapeutics for brain disease, and its optimization. *Neurosurgical Focus* **20**, E12 (2006).

106. Saito, R. & Tominaga, T. Convection-Enhanced Delivery: From Mechanisms to Clinical Drug Delivery for Diseases of the Central Nervous System. *Neurologia medico-chirurgica* **52**, 531–538 (2012).

107. Nogue, G. *et al.* Monitoring Monoclonal Antibody Delivery in Oncology: The Example of Bevacizumab. *PLoS ONE* **8**, e72021 (2013).

108. Liu, S. & Kurzrock, R. Toxicity of targeted therapy: Implications for response and impact of genetic polymorphisms. *Cancer Treatment Reviews* **40**, 883–891 (2014).

109. Omuro A & DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. *JAMA* **310**, 1842–1850 (2013).

110. Chacko, A.-M. *et al.* Targeted delivery of antibody-based therapeutic and imaging agents to CNS tumors: crossing the blood–brain barrier divide. *Expert Opinion on Drug Delivery* **10**, 907–926 (2013).

111. Simpson, L. & Parsons, R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp. Cell Res.* **264**, 29–41 (2001).

112. Towner, R. A. *et al.* ELTD1, a potential new biomarker for gliomas. *Neurosurgery* **72**, 77–90; discussion 91 (2013).

113. Wooten, E. C. *et al.* A study of loss of heterozygosity at 70 loci in anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme with implications for tumor evolution. *Neuro-oncology* **1**, 169–176 (1999).

114. Ang, C., Guiot, M.-C., Ramanakumar, A., Roberge, D. & Kavan, P. Clinical Significance of Molecular Biomarkers in Glioblastoma. *The Canadian Journal of Neurological Sciences* **37**, 625–630 (2010).

115. Cox, J. & Mann, M. Is Proteomics the New Genomics? *Cell* **130**, 395–398 (2007).

116. Price, J. C., Guan, S., Burlingame, A., Prusiner, S. B. & Ghaemmaghami, S. Analysis of proteome dynamics in the mouse brain. *PNAS* **107**, 14508–14513 (2010).

117. Brönstrup, M. Absolute quantification strategies in proteomics based on mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics* **1**, 503–512 (2004).

118. Lichtenstein, A. H. *et al.* Comparison of deuterated leucine, valine, and lysine in the measurement of human apolipoprotein A-I and B-100 kinetics. *J. Lipid Res.* **31**, 1693–1701 (1990).
119. Steiner, S. J., Pfefferkorn, M. D., Fitzgerald, J. F. & Denne, S. C. Protein and energy metabolism response to the initial dose of infliximab in children with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 737–744 (2007).
120. Van den Akker, C. H. P. *et al.* Amino Acid Metabolism in the Human Fetus at Term: Leucine, Valine, and Methionine Kinetics. *Pediatr Res* **70**, 566–571 (2011).
121. Mirand, P. P. Les apports nutritionnels conseillés (ANC) en protéines. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **10**, 61–65 (2003).
122. Hinkson, I. V. & Elias, J. E. The dynamic state of protein turnover: It's about time. *Trends in Cell Biology* **21**, 293–303 (2011).
123. Ferguson, P. L. & Coombs, D. H. Pulse-chase analysis of the in Vivo assembly of the bacteriophage T4 tail. *Journal of Molecular Biology* **297**, 99–117 (2000).
124. Pantel, K. & Alix-Panabières, C. Real-time Liquid Biopsy in Cancer Patients: Fact or Fiction? *Cancer Res* **73**, 6384–6388 (2013).
125. Ceysens, S. *et al.* [11C]Methionine PET, Histopathology, and Survival in Primary Brain Tumors and Recurrence. *AJNR Am J Neuroradiol* **27**, 1432–1437 (2006).
126. De Rouvray, C. *et al.* La leucinoase : définition, formes cliniques, diagnostic, prise en charge thérapeutique et diététique. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **25**, 80–85 (2011).
127. Clark, A. J. *et al.* Neurosurgical management and prognosis of patients with glioblastoma that progresses during bevacizumab treatment. *Neurosurgery* **70**, 361–370 (2012).
128. Ferrara, N., Hillan, K. J. & Novotny, W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **333**, 328–335 (2005).
129. Perez, J. F. & Reeds, P. J. A new stable isotope method enables the simultaneous measurement of nucleic acid and protein synthesis in vivo in mice. *J. Nutr.* **128**, 1562–1569 (1998).

Annexes

Autorisation du Comité de protection des personnes (CPP).